

Neue Dextranderivate als nicht-virale Vektoren im Gentransfer

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Konrad Hotzel
geboren am 03.06.1982 in Gera

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Heinze (Universität Jena)

2. Gutachter: Prof. Dr. Dagmar Fischer (Universität Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Allgemeiner Teil	4
2.1 Gentransfer	4
2.2 Vektoren	6
2.2.1 Virale Vektoren	6
2.2.2 Nicht-virale Vektoren	7
2.2.3 Polyethylenimin und Poly-L-Lysin	13
2.3 Dextran und Dextran-basierte nicht-virale Vektoren	15
2.4 Aminosäuren	17
2.5 Veresterung von Polysacchariden mit Aminosäuren nach Aktivierung durch CDI und Iminiumchlorid	20
3 Spezieller Teil	24
3.1 Synthese von Boc-geschützten Dextran-Aminosäureestern	24
3.1.1 Synthesen durch Aktivierung von Carboxygruppen mit CDI in DMSO	24
3.1.2 Synthesen durch Aktivierung von Carboxygruppen durch CDI in Imidazol	29
3.1.3 Synthesen mit DMF/Oxalylchlorid in LiCl/DMAc	34
3.2 Synthese von Dextran-Aminosäureestern	36
3.2.1 Abspalten der Boc-Gruppe	36
3.3 Protonierungsverhalten und elektrochemische Charakterisierung	46
3.4 Untersuchungen zum Gentransfer	56

3.4.1	Komplexbildung, Komplexstabilität und Schutz vor enzymatischem Abbau	58
3.4.2	Hydrodynamischer Durchmesser und Ladung der Polyplexe	63
3.4.3	Hämokompatibilität und Zytotoxizität	65
3.4.4	Transfektion	69
3.5	Dextran-Aminosäuremischester	72
3.5.1	Synthese und Charakterisierung	72
3.5.2	Untersuchungen zum Gentransfer	74
3.6	Reaktionen mit ungeschützten Aminosäuren	78
3.6.1	Dextran-(<i>oligo</i> -L-Lysin)-ester	80
3.6.2	Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester	88
3.6.3	Untersuchungen zum Gentransfer	94
4	Zusammenfassung	98
5	Experimenteller Teil	101
5.1	Materialien	101
5.2	Messungen	101
5.3	Synthesen	107
5.3.1	N_{α}, N_{ϵ} -di- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl-L-Lysin ^[1]	107
5.3.2	Synthese von Dextran-Boc _{<i>n</i>} -Aminosäureestern (1-3)	108
5.3.3	Peracetylierung/-propionylierung, allgemeine Vorschrift	109
5.3.4	Entschützen der Dextran-Boc _{<i>n</i>} -Aminosäureester zu Dextran-Aminosäureestern (6, 8-14)	109
5.3.5	Synthesen mit ungeschützten Aminosäuren	111
	Literaturverzeichnis	113
	Publikationen	133
	Danksagung	134
	Selbständigkeitserklärung	135

Abkürzungsverzeichnis

AF4	Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation
AGE	Anhydroglukoseeinheit
ATP	Adenosintriphosphat
AR	Aktivierungsreagenz
AS	Aminosäure
Ala	Alanin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BPEI	branched PEI
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
COSY	Correlated Spectroscopy
DAE	Dextran- β -Alaninester
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DGE	Dextran-Glycinester
DLE	Dextran-L-Lysinester
DMAc	N,N-Dimethylacetamid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOE	Dextran-L-Ornithinester
DP	durchschnittlicher Polymerisierungsgrad
DPr	durchschnittlicher Protonierungsgrad

DS	durchschnittlicher Substitutionsgrad
EA	Elementaranalyse
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
H2BC	Heteronuclear Two Bond Correlation
LiCl	Lithiumchlorid
LPEI	lineares PEI
Lys	Lysin
MS	molarer Substitutionsgrad
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PDI	Polydispersionsindex
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly-L-Lysin
PVS	Polyvinylsulfonsäure
RLU	Relative Light Units
RNS	Ribonukleinsäure
SEC	Size Exclusion Chromatography
TFA	Trifluoressigsäure

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die fünf Hauptbarrieren für eine erfolgreiche Transfektion: (A) Bildung eines stabilen Komplexes, (B) Hämokompatibilität, (C) Aufnahme in die Zelle, (D) endosomale Freisetzung und (E) Aufnahme in den Zellkern ^[2] .	2
2.1	Absoluter und relativer Anteil der in klinischen Studien 2015 weltweit verwendeten Vektorklassen ^[3]	8
2.2	Möglichkeiten zur Modifizierung von nicht-viralen polykationischen Vektoren zur Optimierung von Eigenschaften ^[4]	9
2.3	Das Prinzip des <i>proton sponge</i> -Effektes ^[4]	11
2.4	Ausschnitt einer Dextranhauptkette (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F) mit Verzweigung an der Position 3	16
2.5	Ausgewählte natürliche Aminosäuren	19
2.6	Mechanismus der Aktivierung von a) Alkoholen und b) Carbonsäuren mit CDI ^[5]	21
2.7	Mechanismus der Oligomerisierung von α -Aminosäuren durch CDI ^[6] . . .	22
2.8	Veresterung von Cellulose mit Iminiumchloridaktivierung ^[7]	23
3.1	Syntheschema der Dextran-Boc-Aminosäureester und der Dextran-Aminosäureester	25
3.2	¹³ C-NMR-Spektrum eines Boc-geschützten β -Alaninesters (aufgenommen in DMSO-d6)	27
3.3	FTIR-Spektren a) eines Boc-geschützten β -Alaninesters und b) nach Peracetylierung (DS=2,3)	28
3.4	¹ H-NMR-Spektrum eines peracetylierten β -Alaninesters mit $DS_{\beta-Alanin}=1,5$	30
3.5	FTIR-Spektren a) eines β -Alaninesters (9.2d), b) eines L-Lysinesters (10.2d), c) eines Glycinesters (8.2c) und d) eines unsubstituierten Dextrans von <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , $M_w \sim 60000$ g/mol	42
3.6	¹³ C-NMR-Spektren von a) Dextran und b) Dextran- β -Alaninestern mit DS=0,47 (9.2a), c) DS=0,99 (9.2c) und d) DS=1,13 (9.2d)	44

3.7	Nachweis der selektiven Substitution an C2 im ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum eines Dextran- β -Alaninesters (DS=0,45) und einer Molmasse des Ausgangsdextrans $M_w=6000$ g/mol	45
3.8	^{13}C -NMR-Spektren a) eines Dextran-Glycinesters (DS=0,59) und b) eines Dextran-L-Lysinesters (10.2a , DS=0,18)	47
3.9	Ladungsisothermen eines Dextran-Glycinesters (DGE) mit Konzentrationen von a) $c=0,3$ mg/mL und b) $c=0,7$ mg/mL	49
3.10	Ladungsisothermen eines Dextran-Glycinesters (DGE), eines Dextran- β -Alaninesters (DAE), eines Dextran-L-Ornithinesters (DOE) und eines Dextran-L-Lysinesters (DLE)	50
3.11	Stabilität von Dextran-Glycinester (DGE), Dextran- β -Alaninester (DAE), Dextran-L-Ornithinester (DOE) und Dextran-L-Lysinester (DLE) bei verschiedenen pH-Wert-Maxima	52
3.12	FTIR-Spektrum eines Dextran- β -Alaninester a) $t=0$, b) nach $t=1\text{h}$ bei pH=8,5, c) $t=24\text{h}$ bei 8,5 und d) $t=1\text{h}$ bei pH=12,5	56
3.13	Struktur Cholesterol-basierter kationischer Lipide mit Glycin (1) und β -Alanin (2) als Kopfgruppe	60
3.14	DNS-Bindungseffizienz von Dextran- (A) Glycinestern, (B) β -Alaninester und (C) L-Lysinestern nach Bestimmung mittels Fluoreszenz im AccuBlue-Assay	61
3.15	Fotografie der Agarosegele nach Experimenten zum Schutz vor Abbau von Plasmid-DNS durch DNase I mit (A) Dextran- β -Alaninester und (B) Dextran-L-Lysinestern bei verschiedenen N/P-Verhältnissen und DS-Werten	62
3.16	a) Zetapotentiale und b) hydrodynamische Durchmesser der Polyplexe aus DNS und (A)Dextran- β -Alaninester und (B)Dextran-L-Lysinester	64
3.17	Makroskopische Beurteilung der Stufen der Aggregation roter Blutkörperchen nach Behandlung mit Dextran- (A) β -Alaninestern und (B) L-Lysinestern verschiedener DS und Konzentration	66
3.18	Aufnahmen des Aggregationsverhaltens roter Blutzellen nach Behandlung mit a) $0,02\text{ }\mu\text{g/mL}$ b) $0,78\text{ }\mu\text{g/mL}$ und c) $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ Dextranaminosäureester	67
3.19	Hämolyseeigenschaften verschiedener Dextran- β -Alaninester und L-Lysinester bei einer Konzentration von $500\text{ }\mu\text{g/mL}$	68

3.20	Zellviabilitäten muriner Fibroblasten nach 24-stündiger Behandlung mit Dextran- (A) β -Alaninestern und (B) L-Lysinestern verschiedener Konzentrationen und DS	68
3.21	Transfektionseffizienzen von Dextran- (A) β -Alaninestern und (B) L-Lysinestern bei verschiedenen N/P-Verhältnissen	70
3.22	^{13}C -NMR-Spektrum von Dextran- β -Alanin-L-Lysin-Mischester 14a ($\text{DS}_{\beta\text{-Ala}}=0,42$; $\text{DS}_{\text{Lys}}=0,21$)	75
3.23	Vergrößerte Darstellung der Carbonylbanden $\nu_{\text{C=O}}$ a) eines Dextran-L-Lysinesters, b) eines Dextran- β -Alaninesters und c) eines Mischesters bei der Aminosäuren	76
3.24	Fotografie der Agarosegele nach Experimenten zum Schutz vor Abbau von Plasmid-DNS durch DNase I mit Dextran- β -Alanin-L-Lysin-Mischestern verschiedener DS-Werte und N/P-Verhältnisse	77
3.25	Transfektion der Mischester	78
3.26	Struktur eines N-Carboxyanhydrides einer α -Aminosäure	79
3.27	FTIR-Spektren a) einer löslichen Fraktion eines in DMSO synthetisierten (15.1d), b) einer löslichen Fraktion eines in Imidazol synthetisierten (16.1d) und c) einer unlöslichen Fraktion eines in Imidazol synthetisierten Dextran-(<i>oligo</i> -L-Lysin)-esters (16.2d)	83
3.28	^{13}C -NMR-Spektrum eines Dextran-(<i>oligo</i> -L-Lysin)-esters ($\text{DS}=1,73$) . . .	84
3.29	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum eines Dextran-(<i>oligo</i> -L-Lysin)-esters ($\text{DS}=1,73$) und Markierung der Wechselwirkungen des Amidcarbonylkohlenstoffs sowie des Harnstoffcarbonylkohlenstoffs	86
3.30	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum eines Dextran-(<i>oligo</i> -L-Lysin)-esters ($\text{DS}=1,73$) und Markierung der Wechselwirkungen des dominanten L-Lysin-Rückgrates	87
3.31	Reaktionsschema der Synthese der Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester	89
3.32	^{13}C - und DEPT135-NMR-Spektrum eines Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninesters (17b , $\text{DS}=0,40$)	90
3.33	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum eines Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninesters (17b , $\text{DS}=0,40$)	91
3.34	^1H -NMR-Spektrum eines Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninesters (17b , $\text{DS}=0,40$)	93

3.35	FTIR-Spektrum eines Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alanin- esters (17d)	93
3.36	Ladungsisotherme eines Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alanin- esters mit DS=0,55 (17c)	95
3.37	DNS-Bindungskapazität der Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β - Alaninester bei verschiedenen N/P-Verhältnissen	95
3.38	Zellviabilität der Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester bei verschiedenen Konzentrationen	97
3.39	Transfektionseffizienz der Dextran- <i>N</i> -[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alanin- ester bei verschiedenen N/P-Verhältnissen	97

Tabellenverzeichnis

3.1	Signalaufteilung und Formel zur Bestimmung des DS aus peracetylierten/perpropionylierten Proben	29
3.2	Reaktionsbedingungen und DS-Werte der resultierenden Ester nach Synthese in DMSO (80°C, 16 h) unter Aktivierung mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI)	30
3.3	DS-Werte, bestimmt durch ¹ H-NMR-Spektroskopie nach Perpropionylierung, sowie DP _w - und PDI-Werte der in Imidazol synthetisierten Boc-geschützten Ester	32
3.4	DS-, DP _w - und PDI-Werte der in LiCl/DMAc mit Oxalylchlorid/DMF aktivierten Boc-geschützten Ester	36
3.5	DS- und DPr-Werte der entschützten Dextran-Aminosäureester	37
3.6	DP _w und PDI von Dextran-Aminosäureestern nach Entschützen unter verschiedenen Bedingungen bei 25 °C und 25 mM Acetatpuffer/20 mM NaCl-Lösung als Eluent (Ausgangsmaterial Dextran DP _w ~360, PDI=1,53)	40
3.7	Ausgewählte FTIR-Signale von Dextran-Aminosäureestern und ihre Zuordnung	42
3.8	Zuordnung der ¹³ C-NMR-Signale von Dextran-β-Alaninestern	48
3.9	Für elektrochemische Messungen an Dextran-Aminosäureestern verwendete Proben und ihr DS	48
3.10	pK _a -Werte der Aminogruppen verschiedener Aminosäuren sowie ihrer Methyl- und Dextranester	51
3.11	DPr von Dextran-Glycinester (DGE), Dextran-β-Alaninester (DAE), Dextran-L-Ornithinester (DOE) und Dextran-L-Lysinester (DLE) in Abhängigkeit vom pH-Wert	54
3.12	Abhängigkeit der Hydrolyse eines Dextran-β-Alaninesters von pH-Wert und Zeit	54
3.13	Konzentration der gebundenen Aminosäuren am Polymer in Abhängigkeit von pH-Wert und Zeit	57

3.14	DS-Werte der für die <i>in vitro</i> -Charakterisierung verwendeten Dextran-Aminosäureester	59
3.15	Synthesebedingungen und resultierende DS für Dextran- β -Alanin-L-Lysin-Mischester	73
3.16	Bedingungen der Reaktionen von Aminosäuren, sowie Eigenschaften der Produkte	81
3.17	Ausgewählte FTIR-Signale und ihre Zuordnung für Dextran-(<i>oligo</i> -L-Lysin)-ester	83

1 Einleitung

Auf viele Krankheiten, seien es Erbkrankheiten wie Mukoviszidose oder erworbene wie Krebs oder AIDS, hat die Menschheit noch keine zufriedenstellende therapeutische Antwort gefunden. Man kann in vielen Fällen die Symptome bekämpfen und unterdrücken, hat aber noch keine Möglichkeit, viele dieser Krankheiten an ihrem Entstehungspunkt, der Zelle, zu heilen. Seitdem Avery *et al.*^[8] 1944 zeigten, daß es möglich ist, Gene, d.h. Erbinformationen, mittels Nukleinsäuren zu übertragen, gibt es in der Theorie ein Werkzeug, aktiv in solche krankhaften Prozesse auf zellulärer Ebene einzugreifen (Gentherapie).

Das Konzept wurde lange Zeit nicht in großem Maße weiter verfolgt, da es keine stabile Transportform der DNS gab, bis erste klinische Studien Ende der 1980er Jahre das Interesse am Gentransfer (*gene delivery*) und einer möglichen Gentherapie sowie den daraus resultierenden kommerziellen Möglichkeiten wachsen ließen. Dies war der Startschuß für ein seitdem ungebrochenes, starkes Interesse an diesem Forschungszweig.

Durch intensive Forschungen, v.a. an *in vitro*-Systemen, konnten die wesentlichen Hürden herausgearbeitet werden, die einer erfolgreichen Transfektion, d.h. dem Einbringen von Fremdgenen wie DNS in den Zellkern, entgegenstehen (Abbildung 1.1). Mit dem Wissen um diese Barrieren wuchsen auch die Strategien zu ihrer Überwindung. Da die Nukleinsäuren allein nicht in der Lage sind, diese Hürden zu überwinden, sind sog. Vektoren als stabile und stabilisierende Transportsysteme notwendig.

Da diese Barrieren für Viren seit jeher kein Problem darstellen und sie erfolgreich Fremdgene in das Erbgut von Zellen einbringen können, boten sie sich als sog. virale Vektoren an. Die Verwendung von viralen Vektoren ist von zahlreichen Schwierigkeiten begleitet, die einerseits kommerzieller Natur, andererseits mit der Natur der Viren eng verbunden sind und zu massiven gesundheitlichen Nebenwirkungen führen können. Sicherheitsaspekte bei der Herstellung schränken die Verbreitung von viralen Vektoren ebenfalls ein.

Das bisher einzige in der westlichen Welt zugelassene Medikament, das auf dem Gentransfer basiert, verwendet zwar einen viralen Vektor (Glybera, ein Mittel gegen Lipopro-

tein-Lipase-Mangel, 2012 zugelassen), jedoch ist der Bedarf an nicht-viralen Transportsystemen für Nukleinsäuren ersichtlich. In *in vitro*-Experimenten haben sich kationische Polymere (Polyfektion), neben Liposomen verschiedener Art (Lipofektion), in Teilaspekten bewährt.

Aufgrund von Wechselwirkungen der kationischen Ladung mit einerseits der anionischen DNS sowie Zelloberflächen, welche die erfolgreiche Transfektion begründen, andererseits aber auch mit anderen Oberflächen bspw. von Blutbestandteilen, geht mit erhöhter Transfektionseffizienz oftmals eine Erhöhung der Toxizität einher. Man spricht hier vom sogenannten *charge dilemma*. Ein weiterer Grund für die erhöhte Toxizität ist in der synthetischen Natur der verwendeten Polykationen zu sehen. Diese können in vielen Fällen durch den Körper, in Abhängigkeit auch von ihrer Größe, nicht verstoffwechselt werden und akkumulieren im Gewebe, z.B. in der Leber.

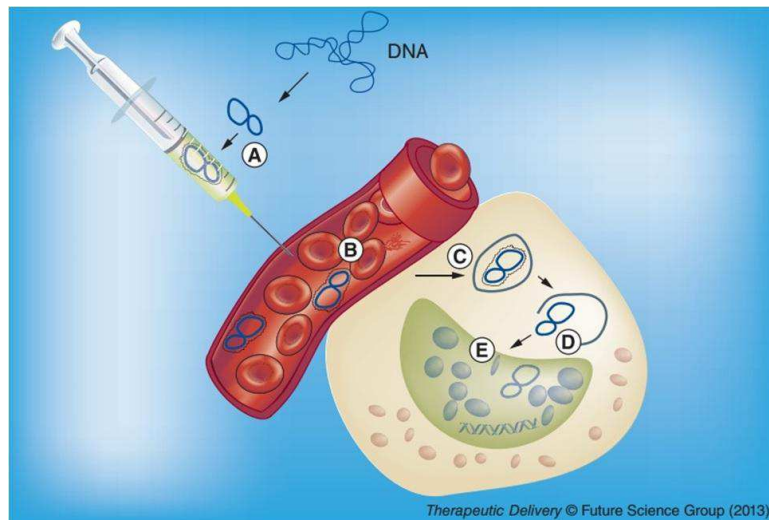


Abbildung 1.1: Die fünf Hauptbarrieren für eine erfolgreiche Transfektion: **(A)** Bildung eines stabilen Komplexes, **(B)** Hämostatibilität, **(C)** Aufnahme in die Zelle, **(D)** endosomale Freisetzung und **(E)** Aufnahme in den Zellkern^[2]

Da das Interesse an nicht-viralen Vektoren zur Gentherapie mit verbesserten Eigenschaften, d.h. hoher Transfektionsrate bei gleichzeitig hoher Verträglichkeit, weiterhin ungebrochen ist, war es Aufgabe dieser Arbeit, neue Vektoren auf Basis von mit Aminosäuren verestertem Dextran zu synthetisieren, chemisch zu charakterisieren und ihre Eignung für den Gentransfer durch *in vitro*-Experimente zu Komplexeigenschaften wie Stabilität, Toxizität und Transfektion zu überprüfen. Aus den gewonnenen Ergebnissen

sollten Struktur-Eigenschaftsbeziehungen hergeleitet werden, um so einen Beitrag zur Etablierung neuer Vektorsysteme zu leisten. Dabei sollte der Fokus, der bisher auf der Verwendung von synthetischen Polymeren lag, unter Umgehung der damit einhergehenden Probleme auf Polymere aus biologisch unbedenklichen, natürlichen Komponenten verschoben werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Gentransfer

Der Begriff Gentransfer oder auch *gene delivery* steht für den Ersatz eines defekten oder Ergänzung eines fehlenden Genes durch das Einschleusen neuer genetischer Informationen zum Zwecke der Therapie ererbter oder auch erworbener Krankheiten.^[2] Aus ethischen Gründen ist man dabei per Gesetz auf somatische Zellen beschränkt^[9], die, im Gegensatz zu Zellen der Keimbahn, das neue Gen nicht an die nächste Generation weitergeben können. Die genetische Information liegt meist in Form von Plasmid-DNS vor und muß für erfolgreiche Transfektion in den Zellkern eingeschleust werden.^[10] Es ist mittlerweile eine Reihe von Techniken entwickelt worden, die *ex vivo* Gene direkt in die Zelle einbringen können, wie Mikroinjektion oder Elektroporation.^[11] Diese Methoden eignen sich jedoch nicht für größere Mengen an zu transfizierenden Zellen und sind für die *in vivo*-Therapie gänzlich ungeeignet. Die Prozesse, die *in vitro* und *in vivo* zur erfolgreichen Transfektion führen, sind zwar noch nicht komplett verstanden, es konnten aber fünf wesentliche Hürden^[2,10,12] herausgearbeitet werden (siehe auch Abbildung 1.1): (A) In Modelluntersuchungen wurde festgestellt, daß ungeschützte Plasmid-DNS eine Halbwertszeit in Mäusen von durchschnittlich ca. 10 Minuten hat.^[13] In dieser Zeit wird sie bereits im Blutstrom durch Nukleasen abgebaut, anschließend über Leber und Nieren ausgeschieden. Dabei verläuft der Abbau *in vitro* meist langsamer als *in vivo*.

Zusätzlich zum schnellen Abbau in der Blutbahn ist die Interaktion der negativ geladenen Nukleinsäuren mit den ebenfalls negativ geladenen Oberflächen von Zellen behindert, was ein Eindringen in das Zellinnere unwahrscheinlich macht.^[4] Dies wird außerdem durch das hohe Molekulargewicht der Plasmid-DNS im Bereich von 1500-20000 Basenpaaren erschwert.^[10] Die Transportform des Gens, bestehend aus einem Vektor, der mit dem Gen beladen wird, muß daher in der Lage sein, derartige Schutzmechanismen der Zellen gegen Fremdgene zu umgehen. Bei viralen Vektoren wird das Fremdgen anstelle des Erbgutes von Viren eingebaut, die natürlicherweise über Abwehrmechanismen gegen den Abbau der DNS verfügen. Der Ansatz bei nicht-viralen Vektoren besteht darin, die

anionische Ladung der Nukleinsäuren zu maskieren. Aufgrund dieser Ladung können Fremdgene von *scavenger*-Rezeptoren erkannt werden, was anschließend zum Abbau durch spezielle Zellen führt.^[13]

(B) Die in Abbildung 1.1 unter (B) genannte Hämokompatibilität ist ein Teil der allgemeinen Verträglichkeit des unbeladenen und des beladenen Vektors und seiner Abbauprodukte mit allen Bestandteilen des Blutplasmas, d.h. mit Blutzellen, Zellen des Immunsystems und Blutproteinen. Beladen heißt dabei, daß ein Komplex mit einem Gen gebildet wurde. Ungenügende Hämokompatibilität kann u.a. zu Thrombosen, Embolien, Entzündungen und Gewebeschädigungen führen.^[14,15] Da die Applikation von nicht-viralen Vektoren meist intravenös erfolgt, müssen die schädlichen Wechselwirkungen mit Bestandteilen der Blutlaufbahn minimal sein, bei gleichzeitiger maximaler gewollter Wechselwirkung mit der Zellwand des anvisierten Zelltypes, was eine spezielle Herausforderung darstellt.

(C) Die Aufnahme des beladenen Vektors in die Zelle kommt meist über endozytotische Mechanismen zustande.^[4] Ganz allgemein bedeutet das, daß sich ein Teil der Zellmembran um den beladenen Vektor stülpt und ihn in einem endosomalen Vesikel in das Zytoplasma überführt.^[16] Dabei muß der Vektor in der Lage sein, die negative Ladung der Nukleinsäuren abzuschirmen und außerdem, beispielsweise durch überschüssige positive Ladungen, die Zellmembran derart zu penetrieren, daß ein Durchgang, meist Clathrin-vermittelt, möglich ist. Die genauen Mechanismen der Durchdringung hängen dabei von der Art der Zelle, der Art und der Größe des verwendeten Vektors, der Hydrophobizität und weiteren Spezifika des jeweiligen Systems ab.^[10,16] Zusätzlich sollte im Vektor bereits eine Selektivität, wenn nicht sogar Spezifität für bestimmte Zellen inkorporiert sein. Beispielsweise konnten durch das Anbringen von Liganden wie Zuckern, Peptiden, Vitaminen, Lektinen, Wachstumsfaktoren und Antikörpern am Vektor 100- bis 1000-fach höhere Zellspezifitäten *in vitro* erzielt werden.^[2]

(D) Nach dem Transport über die Zellmembran befinden sich Fremdpartikel in endosomalen Vesikeln, in denen harsche Bedingungen herrschen. Der pH-Wert sinkt auf ca. 5 und durch die Verschmelzung mit Lysosomen werden in den Vesikeln Verdauungsenzyme aktiviert.^[2] Der Vektor muß auch hier den Schutz gewährleisten und außerdem die Freisetzung der Nukleinsäuren ins Zytoplasma ermöglichen.

(E) Die bereits im Endosom oder im Zytoplasma vom Vektor getrennte Nukleinsäure bewegt sich zum Zellkern. Plasmid-DNS ist aufgrund ihrer Größe beim Durchgang durch die Kernporen in den Zellkern stärker behindert und daher anfällig für die Endonukleasen des Zytoplasmas. Sphärische und stark kondensierte Strukturen haben im Vergleich zu

linearen Gebilden eine höhere Mobilität.^[10] Statistisch betrachtet kann eins von 1000 Plasmid-Molekülen wirklich in den Zellkern eindringen.^[4]

Die Überwindung dieser Hürden ist dabei nur ein Teil der Anforderungen an Vektoren für erfolgreiche Transfektion. Die Toxizität des Vektors, seine Bioabbaubarkeit sowie seine möglichst einfache Herstellung müssen für therapeutische Anwendungen *in vivo* mit berücksichtigt werden. Die Vielzahl an möglichen Variablen im Prozeß des Gentransfers erfordert auch eine hohe Variabilität in der Struktur von Vektoren. Es ist außerdem zu beachten, daß Vektoren, die *in vitro* in einzelnen Aspekten sehr gute Ergebnisse zeigen, diese meist nicht *in vivo* reproduzieren können. Die Anforderungen eines *in vivo*-Systems sind aufgrund vielfältiger möglicher Wechselwirkungen in Einzelexperimenten nicht widerzugeben. Allgemein gilt die Faustregel: jeder Erfolg bei der Überwindung einer Hürde wird mit erhöhter Schwierigkeit bei einer anderen erkauft. Dies wird im folgenden Abschnitt deutlich, in dem verschiedene Vektoren vorgestellt werden.

2.2 Vektoren

2.2.1 Virale Vektoren

Viren sind hochentwickelte biologische Vehikel, die sehr effiziente Wege gefunden haben, um in die Gastzelle einzudringen und deren Reproduktionsmechanismen für ihre eigene Reproduktion zu nutzen.^[17] Im Prinzip ist es die Aufgabe von Vektoren, eine Virusinfektion zu imitieren ohne die sich anschließende Replikation des Virus, sondern nur des gewünschten Gens. Durch die bereits erfolgte Spezialisierung auf Überwindung von zellulären Hürden bieten sich modifizierte Viren als potentielle Vektoren an.

Da es in dieser Arbeit um die Entwicklung von nicht-viralen Vektoren gehen soll, seien virale Vektoren hier nur kurz vorgestellt. Für einen weiterführenden Überblick sei auf die Literatur verwiesen.^[17–19]

Um das Virus an der Replikation zu hindern, werden die dafür benötigten Gene aus dem Virus entfernt, bis sog. replikationsinkompetente Viren entstehen. Die durch diese vermittelte Transfektion von Exogenen in den Zellkern wird in Abgrenzung zur Infektion Transduktion genannt.

Erste therapeutische Erfolge, beispielsweise bei der Heilung des „Schweren kombinierten Immundefekts“ (*severe combined immunodeficiency*, SCID)^[20], wurden immer auch durch die Risiken, die die Verwendung von Viren mit sich bringt, relativiert. Zusätzlich zu ihrem Potential zur Mutagenese und Onkogenese löst die Verwendung viraler Partikel in

Organismen Immunantworten auf verschiedenen Ebenen aus, die tödlich enden können. Dabei reagieren Antikörper mit Eiweißen auf der Oberfläche des Virus und leiten die Reaktion des Körpers ein. Als Folge können die zytotoxischen T-Zellen aktiviert werden, so daß schwere Entzündungen resultieren oder sich Hypersensitivitäten entwickeln. Dies sind mitunter Fragen der Dosierung, wobei man hier immer eine Nutzen-Risiko-Analyse durchführen muß. Ein weiteres Problem stellen die Möglichkeiten der Insertionsmutagenese, d.h. Veränderung von Genen der Zelle, oder der Onkogenese, d.h. der Hemmung von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierung von Onkogenen infolge der Insertion von Fremdgenen, dar. Verwiesen sei auf den Tod durch Leukämie einiger Teilnehmer einer Studie, die sich der Behandlung von SCID mittels muriner Leukämieviren (MLV) gewidmet hatte.^[17] Weitere Probleme der viralen Vektoren sind die mitunter geringe Ladekapazität für Nukleinsäuren und die Veränderung des Zellmetabolismus infolge der Infektion. Aus technologischer Sicht kommt hinzu, daß die *in vivo* erforderlichen Konzentrationen der Titerlösungen nicht immer erreicht werden können, was bisher die Anwendungen meist auf *ex vivo*-Verfahren begrenzt, und die Herstellung viraler Vektoren aufwendig ist, v.a. auch unter Sicherheitsaspekten.

Verwendet werden als Vektoren hauptsächlich Retroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Herpes-Simplex-1-Viren (HSV-1). Die Art des Virus entscheidet über die Effizienz, Sicherheit und die Langzeitwirkung der Therapie^[11]

Der große Vorteil viraler Vektoren ist jedoch ihre bisher kaum übertroffene Effizienz in der Transduktion. Daher ist die Modifikation von Viren sinnvoll. Beispielsweise wird die Selektivität für bestimmte Zellarten erhöht oder die Eigenschaften zweier Virenarten werden in neuartigen Hybridviren kombiniert.^[18] Trotz ihrer Limitationen stellen virale Vektoren aktuell die beste Variante für den Gentransfer dar, was sich auch darin niederschlägt, daß das einzige bisher in der Europäischen Union zugelassene Gentherapeutikum, Glybera, auf einem Adeno-assoziierten Virus basiert. Insgesamt waren 2015 66,4 % aller sich in klinischen Testphasen befindenden Gentherapeutika Viren-basiert (Abbildung 2.1).

2.2.2 Nicht-virale Vektoren

Die Gruppe der nicht-viralen Vektoren ist strukturell vielfältig. Es gibt anorganische Nanopartikel wie $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ^[11], zellpenetrierende Peptide (CPP)^[21], kationische Lipide^[22] und kationische Polymere. Diese verschiedenen Vektoren haben, bedingt durch ihre unterschiedlichen Strukturen, unterschiedliche Mechanismen, die in Kapitel 2.1 vorgestellten Hürden zu überwinden. Daraus resultieren unterschiedliche Eigenschaften wie

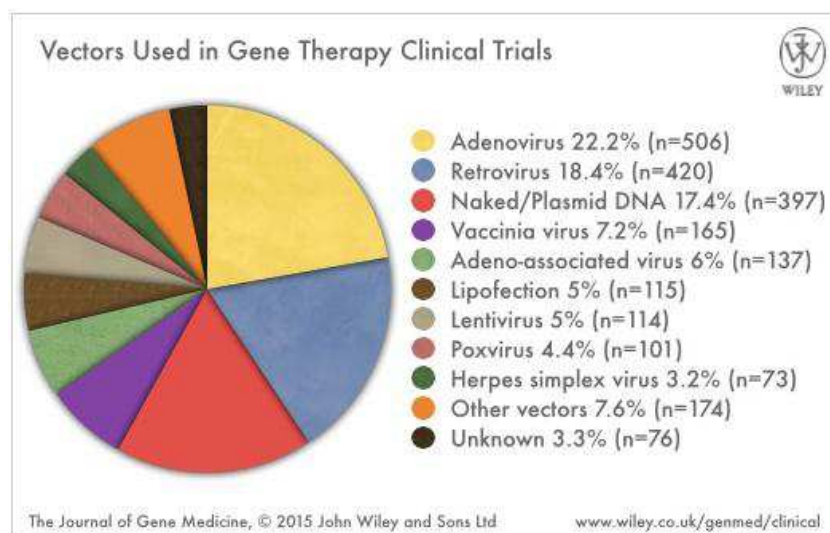


Abbildung 2.1: Absoluter und relativer Anteil der in klinischen Studien 2015 weltweit verwendeten Vektorklassen^[3]

Transfektionseffizienz und Bioverträglichkeit.

Die meisten nicht-viralen Vektoren schneiden bei *in vitro*-Experimenten sehr gut ab, die Überführung in zufriedenstellende *in vivo*-Resultate, wo wesentlich komplexere Systeme vorliegen als bei den *in vitro*-Experimenten, ist aber bisher selten zufriedenstellend gelungen, was mit dem sogenannten *charge dilemma* zusammenhängt. Um dieses zu verstehen, werden kurz bereits existierende Lösungsvorschläge für die Anpassung von Polykationen zur Überwindung der Haupthürden für eine erfolgreiche Transfektion vorgestellt. Sie sind in Abbildung 2.2 zusammengefaßt. Die Strategien zur Überwindung dieser Hürden sind auch auf die Lipofektion übertragbar, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird. Die Gliederung entspricht der von Kapitel 2.1.

(A) Die stabile Transportform der Nukleinsäuren entsteht durch die Bildung eines Komplexes infolge der elektrostatischen Wechselwirkungen der anionischen Säuren mit einem Überschuß an positiver Ladung des Vektors. Dabei beeinflussen Parameter wie Ladungsdichte, Art und Anzahl der Ladungen, Flexibilität des Rückgrates, Architektur und Molmasse der Polymere die Stabilität der Komplexe. Durch die überschüssige positive Ladung kommt es zur Maskierung der anionischen Ladung der Nukleinsäuren.^[2] Die gegensätzlichen Ladungen wechselwirken im Idealfall so stark, daß nicht nur ein stabiler Komplex gebildet wird, sondern die DNS reversibel stark räumlich eingeeengt wird (Kondensation) und so dem Zugriff von DNasen entzogen wird. Dazu müssen mindestens 90 % der Ladungen neutralisiert sein.^[23] Die Aufgabe des Polykations ist es,

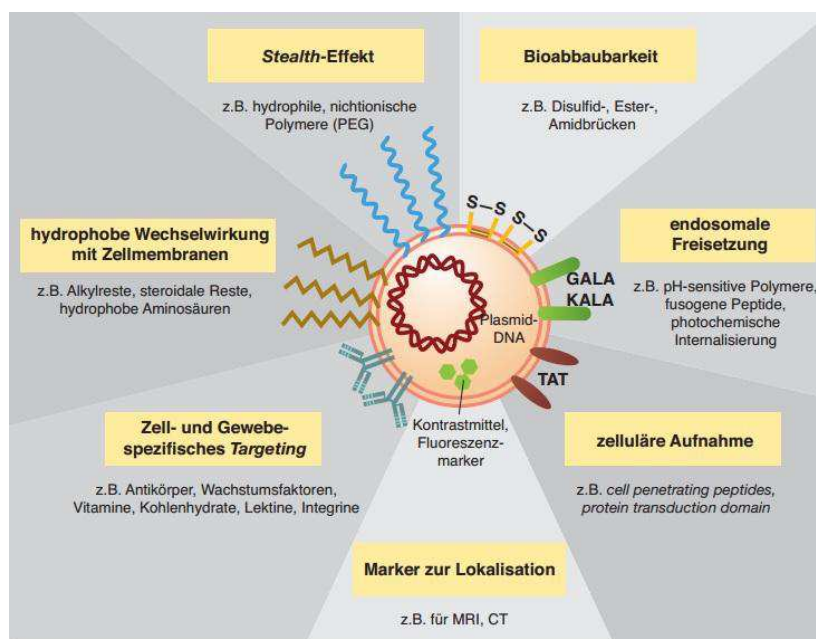


Abbildung 2.2: Möglichkeiten zur Modifizierung von nicht-viralen polykationischen Vektoren zur Optimierung von Eigenschaften^[4]

durch nicht-kovalente reversible Wechselwirkungen die Interaktion der Nukleinsäure mit dem Lösungsmittel zu beeinflussen, die Nukleinsäure lokal zu biegen oder bei Helix-Strukturen zu verdrillen und die Ladungsabstoßung zu vermindern.^[24] Die positive Ladung wird durch Aminogruppen erzeugt, deren pK_a -Wert im physiologisch interessanten Bereich liegt ($5 < pH < 7.4$), so daß sie zumindest teilweise protoniert als Ammoniumgruppen vorliegen.

Der Einfluß der Molmasse des Vektors auf die Komplexstabilität ist belegt.^[25] Je größer die Molmasse ist, umso stabiler ist der gebildete Polyplex.

Es ist daher verständlich, wie Flexibilität und Ladungsverteilung bzw. -dichte des Polymers diese Wechselwirkungen beeinflussen können. Am Beispiel von PEI sei dies verdeutlicht^[26]: Es wurden u.a. bei der Polyplexbildung ein lineares (LPEI) und ein verzweigtes PEI (BPEI) gleicher Molmasse (25000 g/mol) verglichen. Beide waren bei großem Überschuß an positiver Ladung (N/P-Verhältnis > 10 , wobei N für Anteil an Stickstoff der vorhandenen Amino-/Ammoniumgruppen und P für den Phosphor der Phosphatgruppen in Nukleinsäuren stehen) in der Lage, DNS zu kondensieren. BPEI jedoch konnte dies auch schon bei wesentlich geringeren N/P-Verhältnissen ab ca. 3. Dies wird auf die größere Ladungsdichte und die verzweigte Struktur des BPEI im Vergleich zum LPEI zurückgeführt. Schlenk *et al.*^[2] merkten an, daß der Verwendung von BPEI je-

doch entgegensteht, daß sie durch die höhere Ladungsdichte gleichzeitig zu wesentlich umfangreicheren Wechselwirkungen mit negativ geladenen Bestandteilen des Blutkreislaufes und Zellen in der Lage sind. Dies kann zu Hämolyse, Erythrozytenaggregation, Membranschädigungen und Störungen des Zellmetabolismus führen.

(B) Die schädlichen Wechselwirkungen gehören in das Feld der Hämokompatibilität. Diese gehen dabei in zwei Richtungen, die Schädigung des Organismus ist die eine, die Schwächung des Komplexes die andere. Dabei ist bekannt, daß schon in vereinfachten Modellsystemen das umgebende Medium einen wesentlichen Effekt auf den Komplex hat^[23], was die Übertragung der Ergebnisse auf *in vivo*-Anwendungen erheblich erschwert. Um diese Wechselwirkungen wiederum zu minimieren, greift man auf den *stealth*-Effekt zurück, bei dem neutrale Substituenten einen Teil der kationischen Oberflächenladung von Vektoren sterisch daran hindern, mit anionischen Bestandteilen des umgebenden Mediums in Wechselwirkung zu treten. Die Ladung wird dadurch nach außen maskiert. Beispiele für solche Substituenten sind neutrale Polymere wie vor allem PEG^[27,28], aber auch Dextran.^[29] Meist wird diese Strategie an Dendrimeren^[27] und Nanopartikeln angewendet, da es dort eine definierte Oberfläche gibt.

Durch die Maskierung mit PEG werden die Zyto- und Hämotoxizität gesenkt, gleichzeitig wird das Lösungsverhalten günstig beeinflusst und die Verweildauer des Polyplexes in der Blutbahn erhöht.^[27] PEG ist vom Körper nicht abbaubar und sein Verbleib im Organismus kann das Komplementsystem aktivieren, was bis zu Hypersensitivität führen kann. Dies fördert die Bildung von Antikörpern gegen den Vektor. Wegen dieses und weiterer Probleme für Teilnehmer an klinischen Studien zur Testung der Verträglichkeit steht PEG derzeit in der Diskussion.^[2] Vom funktionalen Standpunkt aus hat die Maskierung zusätzlich den Nachteil, daß durch die verminderte Oberflächenladung nicht nur die ungewollten, schädlichen Wechselwirkungen verhindert werden, sondern auch die für die Schritte **(C)** und **(D)** benötigten, gewollten Wechselwirkungen, die zur erfolgreichen Transfektion führen.^[2,28] Lösungsansätze bietet das *PEG shedding*, bei dem nach Reaktion auf einen Stimulus (z.B. pH-Wertänderung^[28], reduzierende Bedingungen bei Disulfidbrücke^[10] o.ä.) das PEG durch Zerstören der Bindung von der Oberfläche entfernt wird. Es herrscht Einigkeit, daß für jedes System eine maßgeschneiderte Lösung nötig ist und das *one-size-fits-all*-Prinzip^[2] kaum realisierbar sein dürfte.

(C) Die kationische Oberfläche der Komplexe führt bereits zu Wechselwirkungen mit der anionischen Zelloberfläche, die die Endozytose ermöglichen.^[10,16] Eine zu hohe Konzentration von positiver Ladung auf der Oberfläche der Zellmembran sorgt jedoch auch dafür, daß diese perforiert und zerstört wird.^[30–32]

Der Durchdringung förderlich sind sogenannte zellpenetrierende Proteine (CPP). Diese sind nicht zwingend auf elektrostatische Wechselwirkungen mit Rezeptoren der Zelloberfläche angewiesen und öffnen dabei jedoch sehr selektiv nicht-endozytotische Wege, die direkt ins Zytoplasma im Innern führen.^[2] Zu ihnen gehören Oligoarginin, HIV-TAT, Penetratin und Transportan.^[2,30,33]

Unspezifische Erhöhung der Aufnahme in der Zelle wird auch durch hydrophobe Modifikationen des Vektors erreicht, beispielsweise durch das Inkorporieren von Aromaten^[34], hydrophoben Aminosäuren^[35] oder langkettigen Carbonsäuren.^[36] Durch die dadurch verstärkte Wechselwirkung mit der Lipidoberfläche der Zellmembran werden die endozytotischen Mechanismen begünstigt.^[16]

(D) Die Mechanismen zur endosomalen Freisetzung sind noch nicht endgültig geklärt, es gibt aber einige Hypothesen dazu. Für nicht-virale Vektoren dürfte die prominenteste These die von Behr^[37] entwickelte des Protonenschwamm-Effektes (*proton sponge*) sein. Diese besagt am Beispiel von PEI, daß die bei physiologischem pH-Wert nicht protonierten Aminogruppen durch den ständigen Einstrom von Protonen über eine ATP-abhängige Protonenpumpe ins Endosom zu geladenen Ammoniumgruppen umgewandelt werden. Infolgedessen strömen in das Endosom zum Ladungsausgleich Chloridionen (Cl^-) sowie aus osmotischen Gründen Wasser ein, was zusammen mit der Ladungsabstoßung und der zunehmenden Starrheit des Polymers zum Zerreißen des Endosoms führt, so daß sein Inhalt ins Zytoplasma freigesetzt wird (Abbildung 2.3). Diese Erklärung stellt eine Entsprechung der wesentlich ausgefeilteren Varianten dar, derer sich Viren bedienen. Für diese hat man eine Reihe von pH-sensitiven Proteinen identifiziert, die durch sinkende pH-Werte im Bereich von 5-7,4 ihre Form ebenfalls verändern.^[38] Zur Theorie des Protonenschwamms ist anzumerken, daß einerseits einige Studien diese recht einfa-

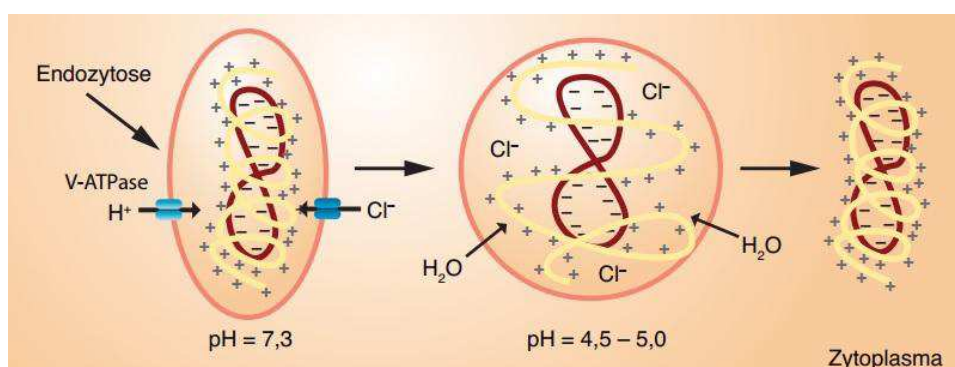


Abbildung 2.3: Das Prinzip des *proton sponge*-Effektes^[4]

che These bestätigen^[39], andererseits, wie es z.B. Benjaminsen *et al.*^[40] darstellen, der *proton sponge*-Effekt nicht unumstritten bzw. so simpel ist, wie Behr es schlußfolgerte. Alternative Freisetzungswege aus dem Endosom ohne Zerstörung des Endosoms werden diskutiert.^[41] Bei der Lipofektion spielt beispielsweise die Fusion des Vektors mit der endosomalen Membran eine Rolle.^[10]

Der Puffereffekt der Aminogruppen mit entsprechend niedrigem pK_a -Wert spielt neben dem *proton sponge*-Effekt außerdem eine weitere entscheidende Rolle, da DNasen durch Abweichen vom pH-Optimum von ca. 5 im Endosom in ihrer Wirksamkeit gehemmt werden.^[31]

Neben diesen inhärenten Mechanismen, die von polykationischen Vektoren genutzt werden, kann man die Freisetzung aus dem Endosom ermöglichen durch die Kopplung des Polykations mit fusogenen Peptiden (*fusogenic peptides*), d.h. kleinen Virenpeptiden oder auch künstlichen Peptiden wie Poly-L-Histidin oder den amphiphilen künstlichen Peptiden GALA, LAGA und KALA. Letztere ändern in Abhängigkeit vom pH-Wert ihre Strukturen und ermöglichen somit Wechselwirkungen mit der endosomalen Membran. GALA, LAGA und KALA unterscheiden sich dabei nur geringfügig in ihrer Aminosäuresequenz.^[2,38,42]

(E) Die Nukleinsäuren verlassen das Endosom in Abhängigkeit vom Vektor im Komplex oder unkomplexiert. Man geht davon aus, daß weniger als 2 % der Nukleinsäuren dem Endosom entkommen, was neben der geringen Aufnahme in den Zellkern die niedrigen Transfektionsraten von nicht-viralen Vektoren erklärt.^[10] Die Dissoziation des Polyplexes ist eine Vorbedingung für die Transfektion. Die Polyplexstabilität ist meist sehr hoch, was v.a. bei Hürde **(B)** von Vorteil ist. Im Zytoplasma schließlich braucht man Mechanismen, die diese Stabilität wieder umkehren, um das Einschleusen der Nukleinsäuren in die zellulären Prozesse zu ermöglichen.^[43] Die Dissoziation der Komplexe geschieht meist in ungenügendem Ausmaß.^[25]

In gewissem Maße trägt die Versteifung des Polymerrückgrates infolge der Ladungsabstoßung durch Protonierung der Aminogruppen zur Dissoziation bei. Es gibt aber ausgefeiltere Konzepte zur Senkung der Polyplexstabilität, beispielsweise durch Ladungsumkehr des Polykations^[43], hydrolytische^[44] oder reduktive^[45] Spaltung des Vektors. Die beiden letzteren Beispiele nutzen die verminderte Komplexstabilität bei geringeren Molmassen des Vektors aus.^[25,46]

Zusammenfassend sinken bzw. steigen sowohl die positiven wie die negativen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Ladung. Das Prinzip des *charge dilemma* kann aber auch auf ladungsunabhängige Sachverhalte, wie oben dargestellt, auf die Formel ausgeweitet

werden: je höher die Transfektionseffizienz, desto höher die Toxizität. Das Problem der Selektivität für bestimmte Zelltypen *in vivo* ist dabei noch nicht angesprochen worden. Dazu sei nur kurz gesagt, daß zur Verbesserung dieser Selektivität zusätzliche mit den Rezeptoren an der Zellmembran interagierende Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Antikörper, Kohlenhydrate u.a. eingesetzt werden.^[47,48]

Obwohl es bisher keinen nicht-viralen Vektor gibt, der zufriedenstellend alle hier dargestellten Anforderungen erfüllt, gibt es doch einige potentielle Kandidaten, die vielversprechende experimentelle Ergebnisse lieferten.

2.2.3 Polyethylenimin und Poly-L-Lysin

Die am besten untersuchten nicht-viralen Vektoren sind PEI und PLL.^[49] Der Goldstandard ist dabei PEI, da es der besterforschte und zumindest in der Transfektion bisher erfolgreichste nicht-virale Vektor ist. Es wurde bereits in zahlreichen Studien *in vitro* und *in vivo* getestet.^[50] Die meisten klinischen Studien befassen sich mit PEI-Derivaten.^[2,12] An PEI läßt sich sehr gut das *charge dilemma* veranschaulichen. Einhergehend mit seiner hohen Transfektionseffizienz besitzt es eine hohe Zelltoxizität.^[49] Die Toxizität von PEI führt in zwei Schritten zum Zelltod. Im ersten Schritt, der spontanen Toxizität, wird die Kernmembran perforiert, was bereits zu Nekrosen führen kann. Im zweiten Schritt, der verzögerten Toxizität, werden die Membranen der Mitochondrien beschädigt und die Prozesse in ihnen massiv gestört, was ebenfalls den Zelltod zur Folge hat. Auch die für die Zelle nicht abbaubare Struktur des synthetischen Polymers PEI und die daraus resultierende Einlagerung in der Zellmembran, die zu Nekrose führen kann, sind Ursachen der Toxizität.^[46] PEI stellt dabei den nicht-viralen polykationischen Vektor mit der höchsten Ladungsdichte dar, dessen Effizienz mit Struktur (verzweigt, linear) und Molmasse variiert.^[51] Durch das Vorhandensein von unterschiedlichen Aminogruppen (primär, sekundär, tertiär) ist es in der Lage, über einen breiten Bereich den pH-Wert zu puffern, was die Transfektion i.a. erhöht.^[31,39] Es bildet mit Nukleinsäuren stabile Komplexe, die teilweise intakt in den Zellkern eindringen können.^[52]

Das PEI mit der größten Verbreitung und der höchsten Transfektion für reines PEI ist dabei BPEI mit einer Molmasse von 25000 g/mol (25K-PEI).^[51,53] Seine Zellviabilität liegt aber lediglich bei 40 %.^[51]

Es ist Gegenstand der Forschung, die Bioverträglichkeit von PEI durch Einführen von stimulireaktiven Linkern wie Disulfidbrücken oder die Toxizität maskierende Substituenten wie PEG zu erhöhen, wobei die Transfektionseffizienz hoch bleiben soll.

Eine Möglichkeit, die vorteilhaften Eigenschaften von PEI auszunutzen, ist es, die bes-

ser verträglichen und ausscheidbaren PEI mit geringen Molmassen an einem bioabbaubaren Polymerrückgrat anzubringen. Auf diese Weise werden am Polymer Zonen mit hoher Ladungsdichte erzeugt, die stabile Komplexe mit DNS bilden und die Vorteile des *proton sponge*-Effektes einbringen, aber beim Abbau verträgliche Abbauprodukte moderater Molmasse ergeben. Beispiele für bioabbaubare Polymerrückgrate sind Poly-L-Succinimid^[54], Poly-L-Glutaminsäure^[55] und Chitosan.^[56] Es werden zum 25K-PEI vergleichbare oder höhere Transfektionseffizienzen bei deutlich verringerter Zelltoxizität erreicht.

Eine andere Möglichkeit ist, wie in Kapitel 2.2.2 besprochen, das Einführen von reduktiv spaltbaren PEI-Derivaten, beispielsweise mit über Disulfidbrücken verbundenen PEI-Einheiten^[57], die in kurzer Zeit reduziert werden können, oder die Einführung von pH-sensitiven Esterlinkern zwischen den PEI-Einheiten.^[58] Die Transfektionseffizienz ist für mit Diesterlinkern verbundenen *oligo*-Ethylenimin in Abhängigkeit von Molmasse und resultierender Struktur vergleichbar mit der von 25K-LPEI.

Durch hydrophobe Modifikationen mittels Alkylspacern variabler Länge (vorzugsweise aus 6 Methylengruppen bestehend) an den primären Aminogruppen wird die Toxizität ebenfalls erheblich gesenkt.^[59] Nach Ladungsausgleich durch eingebrachte primäre Aminogruppen ist die Pufferleistung mit der von 25K-PEI vergleichbar, so daß auch vergleichbare Transfektionseffizienzen gemessen werden.

Maskierung der potentiell toxischen Ladungen mit PEG führt zwar zu geringerer Zytotoxizität, aber auch, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, zur Reduktion der Transfektionseffizienz. Die Komplexe, die mit Hilfe von PEG annähernd neutral an der Oberfläche waren, zeigen eine vernachlässigbare Transfektion.^[51]

Neben PEI gibt es eine Reihe von weiteren synthetischen Polykationen, die auf ihre Eignung als Vektoren im Gentransfer untersucht wurden und spezifische Probleme aufweisen. Ein Beispiel ist dabei PLL, das zwar sehr stabile Polyplexe bildet^[60], aber nur geringe Transfektionen zeigt.^[61] Sonawane *et al.* vermuteten, daß es aufgrund eines zu niedrigen pK_a -Wertes der primären Aminogruppen bei der Protonierung im physiologischen pH-Bereich nicht in der Lage ist, ausreichend zu puffern^[39], wobei Hall *et al.* wiederum zeigten, daß es für erfolgreiche Transfektion nicht auf den Amintyp ankommt.^[62] Die Polyplexe des PLL verlassen i.a. nicht das Endosom.^[49] Es wurde zusätzlich gefunden, daß die gebildeten Komplexe in Abhängigkeit vom umgebenden Medium entweder zu stark oder zu schwach sind, was zur Folge hat, daß die Komplexe nicht dissoziieren, also die DNS nicht freigesetzt wird, oder zu früh dissoziieren, so daß die DNS nicht effektiv vor dem Abbau geschützt werden kann.^[60] Zusätzlich hat PLL in Abhängigkeit

von der Molmasse eine hohe Toxizität.^[49] Vorteile von PLL liegen im effektiven Schutz der Nukleinsäuren vor enzymatischem Abbau.

Die Strategien zur Verbesserung der Eigenschaften sind ähnlich wie für PEI schon beschrieben. Beispielsweise werden kleinere Einheiten PLL, die wie *fusogenic peptides* wirken und zusätzlich mit Nukleinsäuren ausreichend wechselwirken können, an ein polymeres Rückgrat gebunden^[60] oder *fusogenic peptides* an das Polykation gebunden^[63], um die Transfektionseffizienz zu steigern. Die Toxizität wird mit PEG maskiert bei gleichzeitiger Steigerung der Transfektionseffizienz.^[61]

2.3 Dextran und Dextran-basierte nicht-virale Vektoren

Im Gegensatz zu PEI, PLL und anderen synthetischen Polykationen geht man davon aus, daß auf natürlichen Polymeren basierende Polykationen weniger toxisch, dafür bioverträglich und -abbaubar und mit einer geringen Immunogenität verbunden sind. Durch die Einführung verschiedener Substituenten sollen ihre Eigenschaften kontrollierbar sein für die Verwendung als Komplexbildner und Vektoren für Nukleinsäuren.^[64]

Es bieten sich hier Polysaccharide an, wie das in der Medizin bereits vielfach genutzte Dextran. Dextran ist eine Familie neutraler, wasserlöslicher α -(1→6) verknüpfter Glucane. Es wird extrazellulär von einigen Bakterienstämmen gebildet, hauptsächlich der Gattungen *Leuconostoc* und *Streptococcus*.^[65] Je nach Bakterium und äußeren Bedingungen wie Medium oder Temperatur können bis zu 50 % der glykosidischen Bindungen zu α -(1→2), α -(1→3) oder α -(1→4) verknüpften Nebenketten gehören.^[65,66] Dabei steigt der PDI mit steigender Molmasse, was durch die erhöhte Verzweigungsdichte erklärt wird.^[67] Das Polymerrückgrat ist dabei flexibel, so daß Dextran in Lösung als statistisches Knäuel vorliegt.^[65] Außerdem sind Dextranlösungen über Jahre stabil. Das dabei aufgrund positiver Eigenschaften wie Wasserlöslichkeit, sehr niedriger Immunogenität und Antigenität, guter Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit am besten untersuchte und am meisten angewendete Dextran ist dabei das von *Leuconostoc mesenteroides* B-512F produzierte (Abbildung 2.4), welches 5 % α -(1→3)-verknüpfte Seitenketten^[65] enthält, die meist eine oder zwei Glukoseeinheiten umfassen, mit einem deutlich geringerem Anteil an höherkettigen Seitenketten.^[68] Dieses Dextran ist im Folgenden als Dextran bezeichnet, wenn nicht anders vermerkt.

Dextrane, die in die Blutbahn gelangen, beispielsweise durch Injektion, werden in Abhängigkeit ihrer molaren Masse zu 40-50 % wieder ausgeschieden, der Rest wird durch α -(1→6)-Glykosidasen, die sich in Leber, Niere, Milz oder Verdauungstrakt befinden,

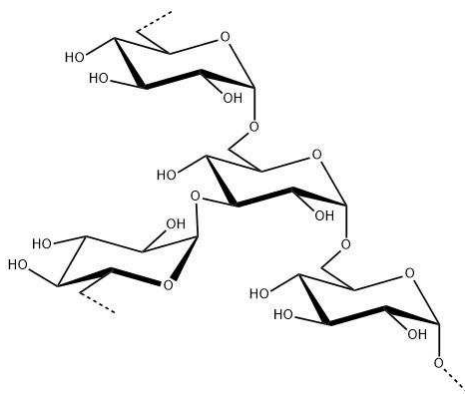


Abbildung 2.4: Ausschnitt einer Dextranhauptkette (*Leuconostoc mesenteroides* B-512F) mit Verzweigung an der Position 3

zu Glukose abgebaut.^[69] Im Magen-Darm-Trakt befinden sich außerdem Bakterien, die Dextran ebenfalls abbauen können.^[70]

Es werden jährlich 2000 t Dextran industriell durch Fermentation aus Saccharose gewonnen.^[66] Anwendung findet Dextran in der Klinik seit den 1940er Jahren als Blutplasmaexpander.^[65] Das native Dextran muß dabei noch durch partielle Hydrolyse und Auftrennung auf die gewünschten Molmassen eingestellt werden.^[67]

Aus chemischer Sicht ist Dextran ein in Wasser, sowie einer Vielzahl organischer Lösungsmittel wie DMSO, DMAc, DMF und anderen gut lösliches Polymer mit drei sekundären Hydroxygruppen je AGE und ca. 1,5 % primären Hydroxygruppen an den Endgruppen.^[65] Diese stehen zur Derivatisierung zur Verfügung. Die Hauptzahl der Derivate sind Ether oder Ester. Obwohl die Hydroxygruppen alle sekundär sind, unterscheiden sie sich für Veretherungen und Veresterungen in ihrer Reaktivität nach folgendem Schema: $C2:C3:C4=8:1:3,5$ für Veretherungen, $C2:C3:C4=k_2>k_3=k_4$ bei Veresterungen.^[65] Die Unterschiede in der Reaktivität werden mit der Nähe von Kohlenstoff C2 zum anomeren Kohlenstoff C1 erklärt.

Auch einige Derivate des Dextrans haben bereits medizinische Anwendung gefunden oder wurden aufgrund ihrer mitunter vorteilhaften Eigenschaften diskutiert. Beispiele sind Dextransulfate, die lange wegen anti-Erythrozyten-aggregierender und antithrombotischer Wirkung als möglicher Heparinersatz erforscht wurden, oder Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran), das zur Lagerung von zur Transplantation vorhergesehenen Organen verwendet werden kann und Cholesterin-senkende Wirkung besitzt.^[65] Die antibakteriellen Eigenschaften von Polyurethan-Dextran-Fasern lassen sich z.B. bei Wundauflagen nutzen.^[71]

Es gibt bei der Verwendung von Dextran in Vektorsystemen zwei Ansätze. Der eine ist es, das neutrale, polymere Rückgrat von Dextran mit kleinen Aminogruppen-haltigen Molekülen zu derivatisieren. Das erste, seit den 1960er Jahren für seine Eignung im Gentransfer untersuchte Derivat, ist DEAE-Dextran.^[72,73] Dies hat sich jedoch aufgrund niedriger Transfektionseffizienz und relativ hoher Zytotoxizität^[74] nicht durchgesetzt. Chemisch sind Polymer und Substituent über eine Ethergruppe verbunden. Weitere synthetische Substituenten wie Poly-Amidoamin wurden ebenfalls erfolgreich zur Derivatisierung von Dextran genutzt und konnten ihre positiven Eigenschaften in Bezug auf Transfektion und niedrige Toxizität einbringen.^[75] Als Substituenten eignen sich ebenfalls Oligoamine wie Spermin. Dieses wurde beispielsweise an teilweise oxidiertem Dextran als Imin am Dextran gebunden.^[76] Die Polymere weisen geringe Toxizitäten auf und transfizieren so gut, daß sie bereits *in vivo* getestet wurden.^[77] Neben Spermin wurden auch weitere natürliche Substanzen wie das Oligopeptid Protamin^[78] zur Derivatisierung genutzt, mit zufriedenstellenden Eigenschaften beim Gentransfer. Ein Beispiel für ein einfacheres polyanionisches Dextranderivat ist Dextransulfat, das erfolgreich in komplexen Nanopartikeln zum Gentransfer verwendet wurde.^[79]

Die andere Verwendung von Dextran in Vektorsystemen ist in Dextran-*graft*-Copolymeren. Dextran-*graft*-poly-(2-dimethylamino)-ethylmethacrylat wurde bereits sowohl *in vitro* wie *in vivo* erfolgreich zur Transfektion in Tumorzellen eingesetzt, so daß das Tumorstadium behindert wurde.^[80] Dabei zeigte das Polymer gleiche Toxizität, aber deutlich höhere Transfektion als der kommerzielle Vektor Lipofectamin 2K. Zur Abmilderung der schädlichen Effekte von PEI bei gleichzeitiger hoher Transfektionseffizienz wurden PEI geringer Molmassen an teilweise oxidiertem Dextran substituiert.^[81]

Die gute Biokompatibilität und niedrige Toxizität von Dextran und seiner Derivate wie das polyanionische Carboxymethyldextran werden zur Maskierung der Eigenschaften von PEI-DNS-Komplexen genutzt.^[29,82] Die resultierenden Polymere haben eine längere Verweildauer^[29] bzw. resultieren aus solchen Konjugaten von BPEI und Carboxymethyldextran untoxische Komplexe, wobei deren Transfektionseigenschaften nicht beeinflußt werden.^[82]

2.4 Aminosäuren

Aminosäuren stellen eine Klasse von Verbindungen dar, die mindestens eine Carboxy- wie auch eine Aminofunktion tragen und sowohl den Carbonsäuren als auch den Aminen zugeordnet werden können. Die natürlich vorkommenden Aminosäuren weisen eine

Vielzahl von weiteren funktionellen Gruppen (z.B. Thiolgruppe, Hydroxygruppe, Imidazolylgruppe) sowie strukturellen Merkmalen (z.B. Alkylreste, aromatische Reste, Heterocyclen) auf (Abbildung 2.5). Als Bausteine des Lebens sind sie die Basis von Proteinen und spielen in biologischen Systemen wichtige Rollen oder bilden strukturgebende Proteine. Die natürlich vorkommenden Aminosäuren (außer Glycin, das keinen chiralen Kohlenstoff trägt) liegen in der L-Konfiguration vor. Die zur Proteinsynthese genutzten Aminosäuren tragen die Aminogruppe am α -Kohlenstoff. Es gibt neben den größtenteils proteinogenen α -Aminosäuren noch natürlich vorkommende nicht- α -Aminosäuren wie β -Alanin und γ -Aminobuttersäure. Natürliche Aminosäuren sind in der Biosphäre genetisch codiert oder kommen als Stoffwechselzwischenprodukte vor (Ornithin).^[83] Für synthetische Aminosäuren hat sich eine Vielzahl an Synthesestrategien etabliert.^[83,84] Durch die Bi- oder Oligofunktionalität der Aminosäuren ist es für kontrollierte Reaktionen notwendig, die nicht erwünschten Reaktionspartner durch Einführen einer Schutzgruppe der Reaktion zu entziehen.^[85] Aufgrund der schwächeren Nukleophilie der Carboxygruppe ist es nicht immer notwendig, diese zu schützen. Für die Carboxylgruppe haben sich Ester als Schutzgruppe etabliert, die entweder sauer (*tert*-Butylester), basisch (Methylester) oder durch katalytische Hydrierung (Benzylester) entfernt werden können.^[86]

Aminogruppen können ebenfalls durch eine Vielzahl von Schutzgruppen blockiert werden. Hierbei soll die Nukleophilie des Stickstoffs herabgesenkt werden, um ihn so der Reaktion zu entziehen.^[85] Es haben sich v.a. Gruppen etabliert, die das Amin als Carbamat schützen. Diese lassen Racemisierung meist nicht zu. Zu den Vertretern gehören die Benzyloxycarbonylgruppe (Cbz)^[87], die durch katalytische Hydrogenierung oder im Säuren wieder gespalten wird, die 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc)^[88], die im Basischen entfernt wird, sowie die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (Boc)^[89], die im Säuren abgespalten wird. Letztere wird vorwiegend über di-*tert*-Butyldicarbonat (Boc₂O) oder 2-(*tert*-Butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril (Boc-ON) an der Aminogruppe eingeführt.^[85] Das Einführen von Schutzgruppen ist eine Vorbedingung für die Synthese von Peptiden nach Merrifield^[90], bei der Amidbindungen zwischen verschiedenen Spezies von Aminosäuren gebildet werden, die an Carboxyl- oder Aminogruppe geschützt sind. Ist man nicht an einer kontrollierten Reaktion oder komplexen Peptidstrukturen interessiert, können unter entsprechender Aktivierung der Carboxylgruppe auch ungeschützte Aminosäuren miteinander zu *oligo*-Peptiden in einem Schritt reagieren.^[6,91]

Veresterungen von Aminosäuren werden in der Regel unter saurer Katalyse mit dem entsprechenden Alkohol durchgeführt.^[85] Die Synthese von Estern ungeschützt eingesetzter

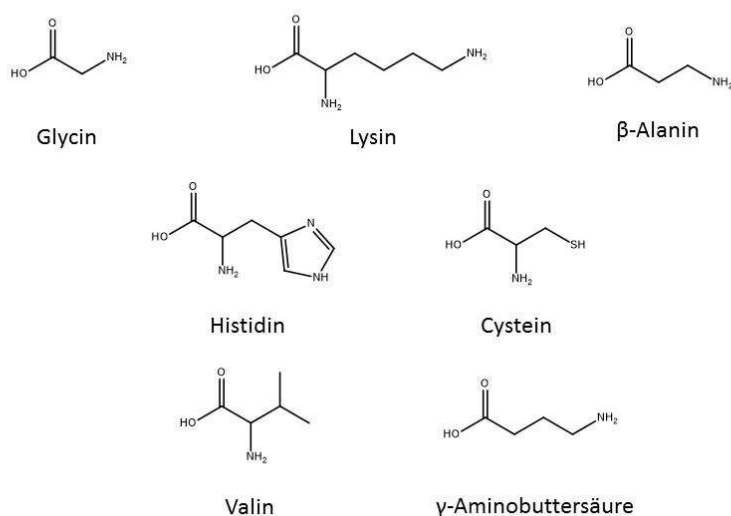


Abbildung 2.5: Ausgewählte natürliche Aminosäuren

Aminosäuren in ionischen Flüssigkeiten ist auch ohne Säurekatalyse möglich.^[92] Die für die Carbonsäuren etablierten Methoden der Veresterung^[93], bei denen die Elektrophilie des Carboxylkohlenstoffs durch Derivatisierung erhöht wird, sind für N-geschützte Aminosäuren auch anwendbar. Beispielsweise lassen sich aus Säurehalogeniden mit den jeweiligen Alkoholen Ester bilden.^[94] Die N-geschützten Aminosäuren können auch *in situ* aktiviert werden. Dies kann beispielsweise mit p-Toluolsulfonsäurechlorid^[95] oder Dialkylcarbodiimiden, beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) unter 4-(Dimethylamino)pyridinkatalyse^[96] oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)^[97], erfolgen. Eine weitere Variante ist die Aktivierung mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI).^[98] Ohne Katalyse, Schutzgruppen oder Aktivierung ist Veresterung von Aminosäuren auch enzymatisch möglich.^[99]

Die strukturelle Vielfalt der Aminosäuren läßt sie an vielen Stellen des Gentransfer-Prozesses eine Rolle einnehmen. Beispielsweise als Vektor, wie bereits am Beispiel PLL in Kapitel 2.2.3 besprochen. Neben PLL haben auch weitere synthetische Polykationen auf Aminosäurebasis Interesse geweckt, z.B. Poly-L-Ornithin^[100]. Dieses ist ähnlich wie PLL mit relativ hoher Toxizität bei geringer Transfektionseffizienz belastet. Daneben gibt es auf Histidin basierende Copolymere^[101], die die Pufferkapazitäten von Histidin

und seine fusogenen (siehe Kapitel 2.2.2) Eigenschaften ausnutzen. Arginin-reiche Peptide können die Aufnahme in der Zelle erleichtern^[102] und begünstigen die erfolgreiche Transfektion.^[103] Zur Modifikation von Lipiden werden Aminosäuren auch genutzt und erfolgreich in der Lipofektion eingesetzt.^[104]

2.5 Veresterung von Polysacchariden mit Aminosäuren nach Aktivierung durch CDI und Iminiumchlorid

Polysaccharide können als Polyalkohole ebenfalls mit Carbonsäuren verestert werden.^[93] Die geschützten Aminosäuren reagieren, wie in Kapitel 2.4 dargestellt, bei der Aktivierung des Carbonylkohlenstoffs wie einfache Carbonsäuren. Besonders elegant sind *in situ*-Aktivierungen durch Reagenzien wie CDI oder Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Dabei werden nicht mehr reaktivere Spezies wie Säurechloride oder Säureanhydride vorgelegt, sondern in der Reaktionslösung gebildet und gleich wieder umgesetzt.

CDI wurde 1956 erstmals durch Staab synthetisiert, daher auch der Name *Staab-Reagenz*, und im weiteren ausgiebig untersucht.^[105,106] Die Reaktivität von CDI beruht im Gegensatz zum Harnstoff auf dem starken Elektronenzug der zwei Imidazolringe am Carbonylkohlenstoff. Dadurch ist es ein wirksamerer Carbonylüberträger als Phosgen.^[105] CDI kann durch Aktivierung eine Vielzahl an Reaktionen begünstigen: Es reagiert in quantitativer Ausbeute mit Carbonsäuren zu Carbonsäureimidazolen, die zum Ester weiter reagieren können, mit Alkoholen zu Kohlensäurediestern, mit Aminen zu Harnstoffen und mit Carbonsäuren und Aminen zu Amiden. Es ist auch als Reduktionsmittel einsetzbar.^[106] Als Nebenprodukte bleiben nur Imidazol und das gasförmige CO₂.

Bei der Veresterung bildet sich erst bei Umsetzung mit der Carboxygruppe das Säureimidazolid, das einen starken Elektronenzug zum Imidazolidring entwickelt und so Elektronendichte vom Carbonylkohlenstoff entfernt, so daß dieser besser mit der nukleophilen Alkoholkomponente reagieren kann. Durch die mögliche Reaktion der Hydroxygruppen des Polysaccharids kann bei vorzeitiger Zugabe eine Vernetzung nach Abbildung 2.6 auftreten.^[93]

Durch die gezeigte Vielseitigkeit der Reaktionen mit verschiedensten Gruppen muß die Aminogruppe bei der Verwendung von Aminosäuren durch eine Schutzgruppe blockiert werden, um eine kontrollierte Reaktion durchführen zu können. Ist dies nicht der Fall, laufen zwei Reaktionen in Anwesenheit eines Polysaccharides ab: die Esterbildung und die Oligomerisierung von α -Aminosäuren, die im Gegensatz zu β -Aminosäuren nach Abbildung 2.7 einen stabileren Fünfring mit CDI ausbilden als der hypothetische Sechsring.

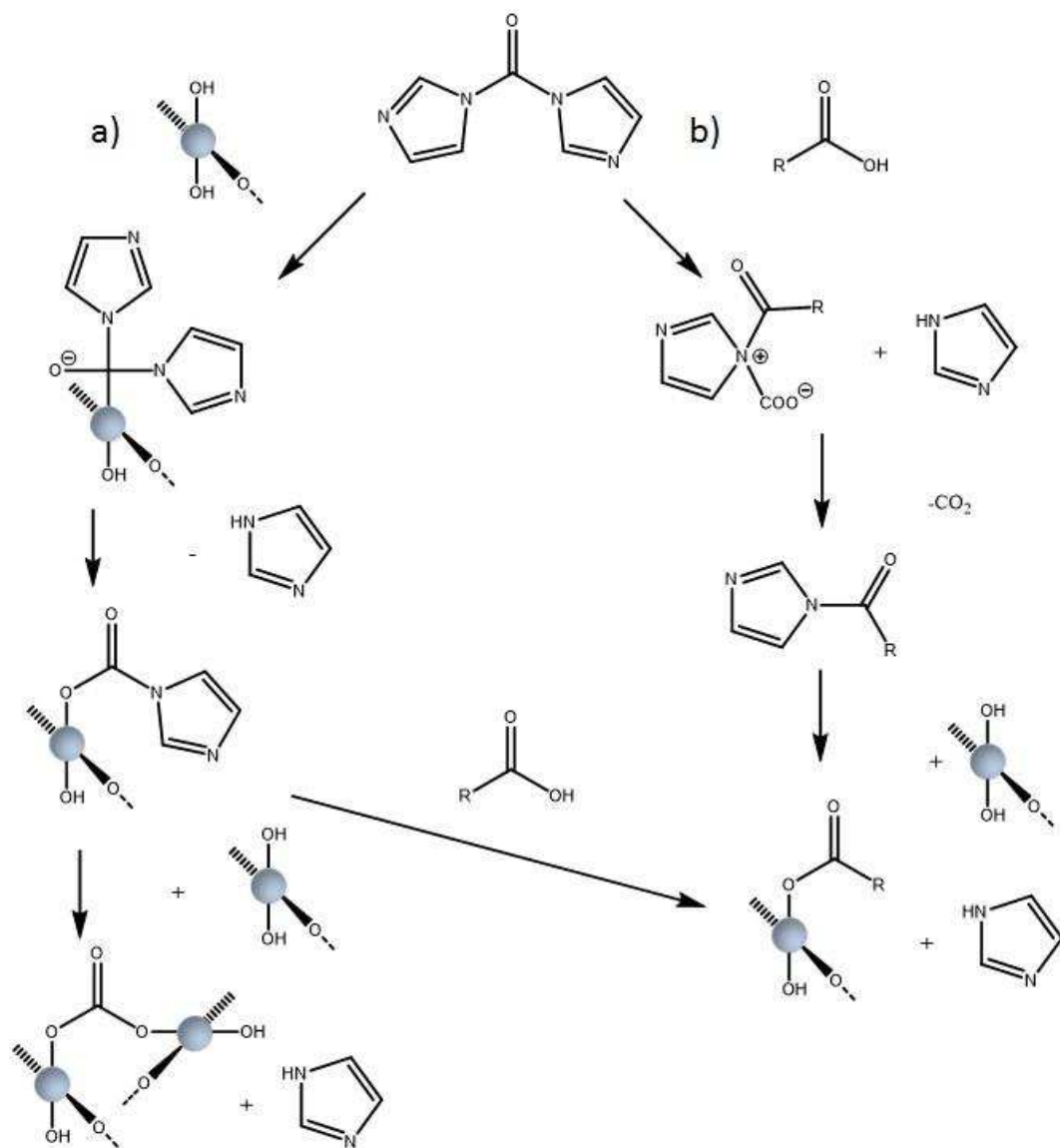


Abbildung 2.6: Mechanismus der Aktivierung von a) Alkoholen und b) Carbonsäuren mit CDI^[5]

Dieser wird zur β -Isocyanatsäure zerfallen.^[6] Dazu reagiert CDI erst mit der nukleophileren Aminogruppe zu einem Harnstoffderivat, das mit der Carboxygruppe zu einem N-Carboxyanhydrid weiterreagiert unter Entfernen des Imidazols. Diese wiederum kann nun eine Peptidbindung knüpfen, so daß die Aminosäure oligomerisiert wird (Abbildung 2.7).

Will man nach Liu und Orgel^[6] die Oligomerisierung auch für β -Aminosäuren bei gleichzeitiger Veresterung durchführen, muß man auf Aktivierungsreagenzien zurückgreifen, die direkt die Carboxylgruppe aktivieren und bei denen nicht das N-Carboxyanhydrid gebildet wird. Beispiele derartiger Aktivierungsreagenzien sind Carbodiimide^[6] oder auch Iminiumchloride.^[7]

Die *in situ*-Aktivierung von Carbonsäuren mit Iminiumchloriden stellt eine weitere schonende Art dar, Polysaccharide zu verestern.^[107] Bei Veresterungen von Polysacchariden zeichnen sich die so erhaltenen Produkte durch eine hohe Reinheit aus^[108], was v.a. für medizinische Anwendungen einen großen Vorteil darstellt. Bei der Reaktion wird das Lösungsmittel DMF mit einem Chlorierungsreagenz umgesetzt in einer der Bildung des Vilsmeier-Reagenz analogen Reaktion. Wird dabei Oxalylchlorid eingesetzt, entstehen lediglich Gase, die aus der Reaktionslösung leicht zu entfernen sind, und DMF wird rückgebildet. Weitere Nebenreaktionen sind nicht bekannt^[93]. Es formt sich im ersten Schritt das Iminiumchlorid *in situ*, aus dem sich mit der Säure ein 1-Carboxy-Iminium bildet, dessen reaktiver Carbonylkohlenstoff mit den Hydroxylgruppen des Polysaccharides reagiert und so der Ester entsteht (siehe Abbildung 2.8).^[7] Der Polymerabbau infolge der Reaktionsbedingungen ist mit 15 % als gering einzuschätzen. Die auf diese Art aktivierten Aminosäuren sind bereits in der Peptidsynthese zur Weiterreaktion mit Carboxyl-geschützten Aminosäuren angewendet worden.^[109] Liegen die Aminosäuren

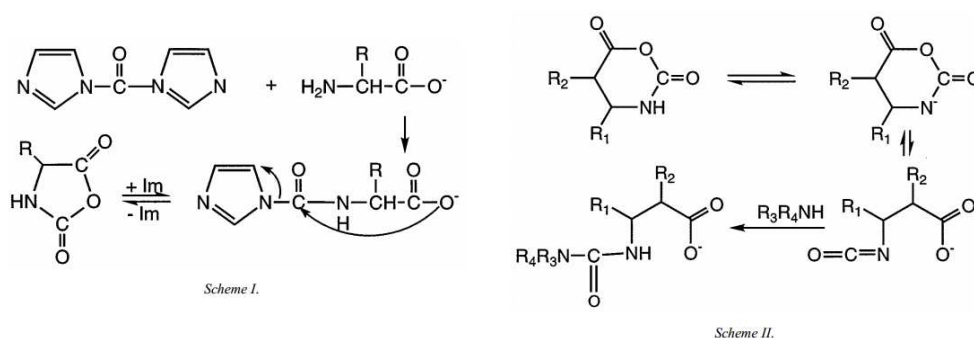


Abbildung 2.7: Mechanismus der Oligomerisierung von α -Aminosäuren durch CDI^[6]

ungeschützt vor, ist nach Liu und Orgel^[6] damit zu rechnen, daß nur die nicht- α -Aminosäuren oligomerisieren, da sie nicht das 2,5-Diketopiperazin bilden können, das die Oligomerisierung inhibiert.

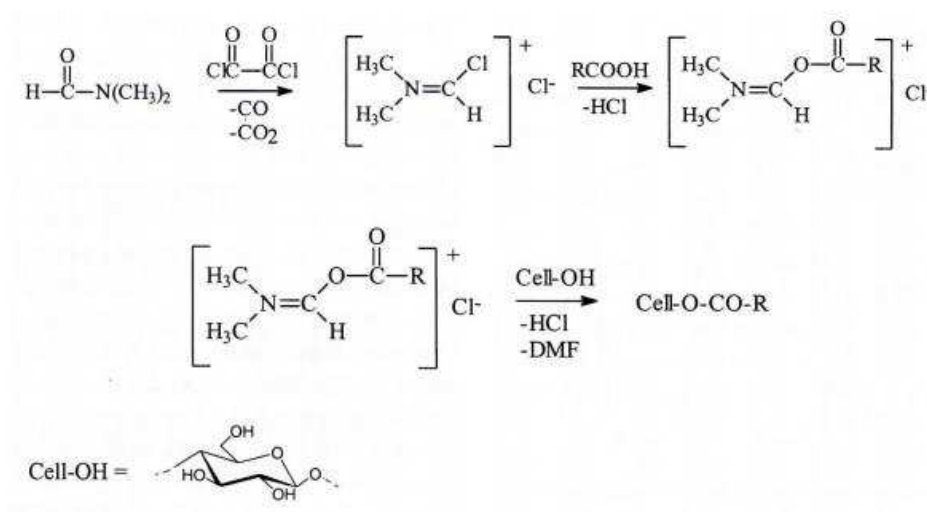


Abbildung 2.8: Veresterung von Cellulose mit Iminiumchloridaktivierung^[7]

3 Spezieller Teil

3.1 Synthese von Boc-geschützten Dextran-Aminosäureestern

Die Herstellung von Dextran-Aminosäureestern wurde als Zwei-Schritt-Synthese durchgeführt (Syntheschema Abbildung 3.1). Dies war notwendig aufgrund der bifunktionalen Struktur von Aminosäuren, bei denen neben der Carboxylgruppe und möglichen weiteren reaktiven Gruppen (z.B. Hydroxylgruppe, Thiolgruppe) auch mindestens eine Aminogruppe vorliegt. Strukturell bieten Aminosäuren eine Vielzahl von Möglichkeiten und weiteren Funktionalitäten, jedoch wurde sich bei der Synthese der Dextranester hauptsächlich auf Glycin, β -Alanin und L-Lysin beschränkt. Glycin ist dabei die einfachste Aminosäure, β -Alanin das um eine CH_2 -Gruppe verlängerte Homologe. Der erste Schritt beinhaltete die Synthese von Estern durch Einsetzen von Boc-geschützten Aminosäuren und die Aktivierung der Carboxylgruppen durch CDI in DMSO oder geschmolzenem Imidazol sowie unter Aktivierung mit Iminiumchlorid in LiCl/DMAc.

3.1.1 Synthesen durch Aktivierung von Carboxygruppen mit CDI in DMSO

CDI wurde bereits erfolgreich zur Aktivierung Boc-geschützter Aminosäuren verwendet.^[110] Boc-geschützte Aminosäuren wurden zusammen mit CDI in DMSO gelöst. DMSO ist ein gutes organisches Lösungsmittel für Dextran und organische Säuren sowie chemisch inert gegenüber CDI. Die Boc-geschützten Säuren und das CDI wurden dabei in verschiedenen Molverhältnissen (Anhydroglucoseeinheit:Aminosäure, AGE:AS) von 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 umgesetzt, um so die Auswirkungen auf den DS-Wert studieren zu können. Die Säure und CDI sind dabei immer im gleichen Verhältnis eingesetzt worden, um die Aktivierung aller Carboxylgruppen zu gewährleisten. Die AGE hat drei Hydroxylgruppen, die mit der aktivierten Säure reagieren können. Bei einem Molverhältnis AGE:AS von 1:4 liegt die Säure im Überschuß vor. Die Aktivierungsreaktion wurde un-

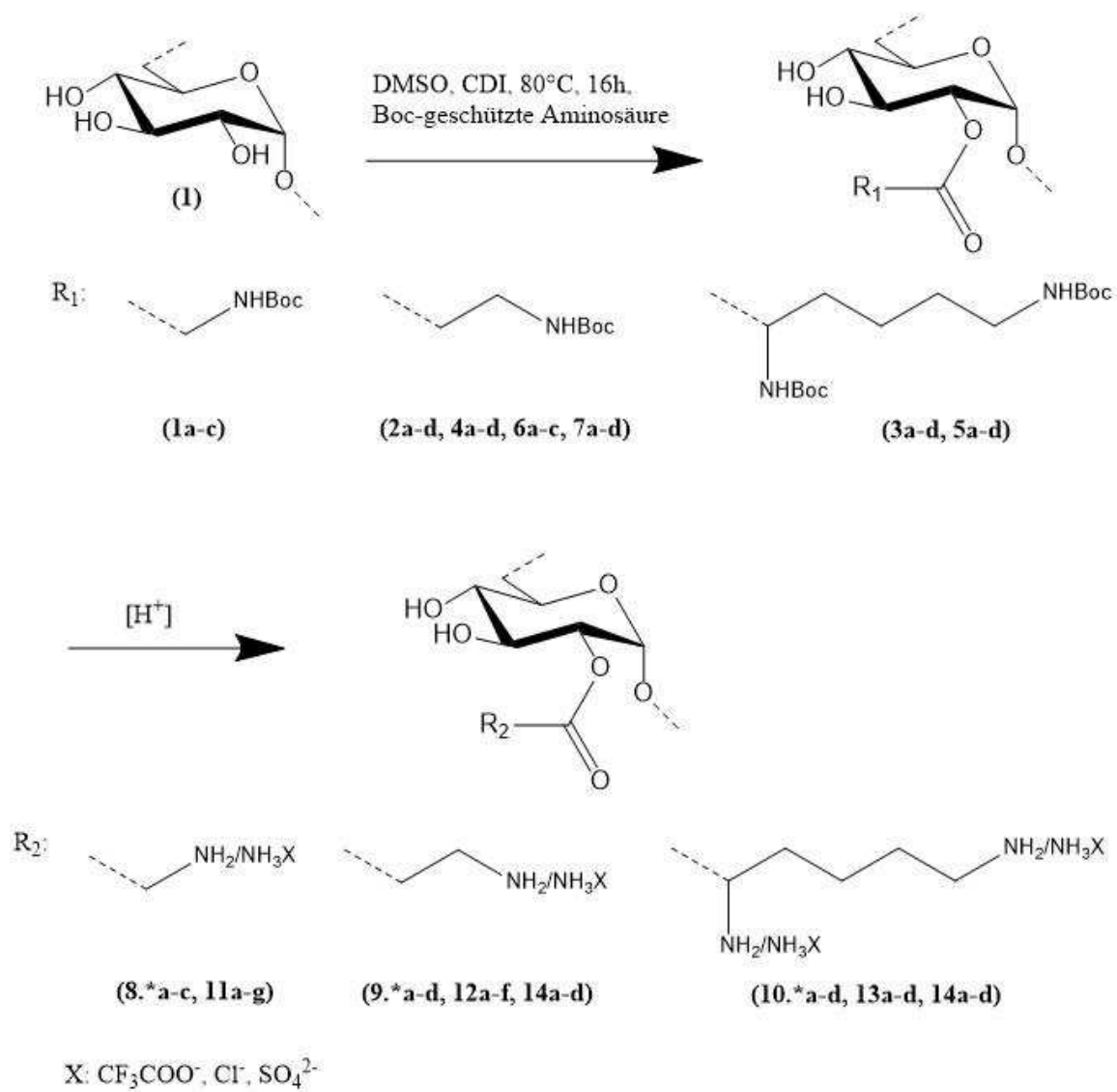


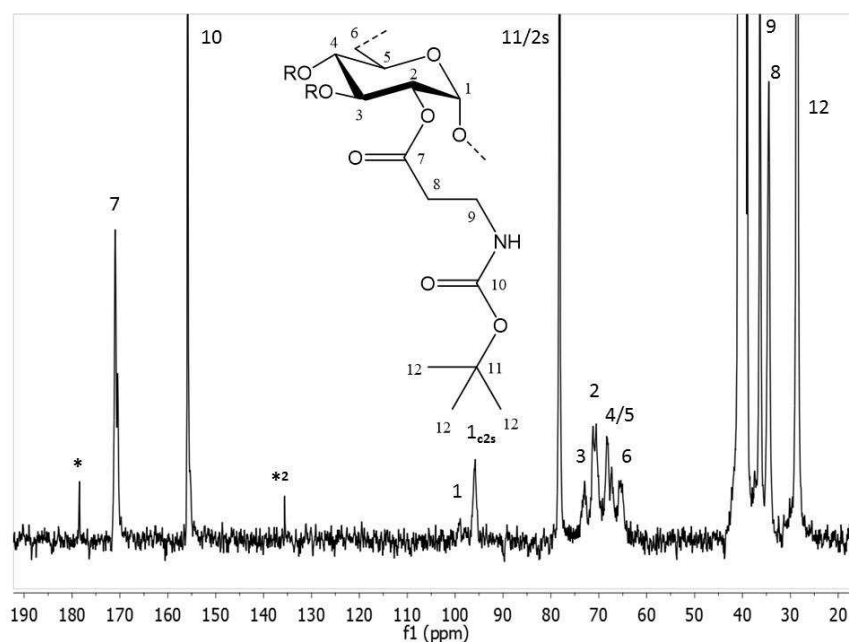
Abbildung 3.1: Syntheschema der Dextran-Boc-Aminosäureester und der Dextran-Aminosäureester

ter Rühren bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Mechanismus der Aktivierung ergibt als Nebenprodukte lediglich Imidazol, das beim Aufreinigen des Produktes aufgrund seiner sehr guten Löslichkeit in nahezu allen Lösungsmitteln ausgewaschen wird, und CO_2 . Die Bildung des Säureimidazolids wurde über einen Blasenähler verfolgt und ist nach einer Stunde abgeschlossen, wenn kein CO_2 der Reaktionslösung entweicht. Desweiteren wird der pH-Wert nur wenig verändert und es kommt nicht zum Kettenabbau durch Spaltung der glykosidischen Bindung. Durch die verzögerte Zugabe des Dextrans wird die Konkurrenzreaktion der Vernetzung verhindert. Vernetzung bedeutet die Aktivierung der Hydroxylgruppen des Dextrans und Bildung einer Carbonatbrücke (Abbildung 2.6 a). Nach Zugabe des Dextrans wird auf 80 °C erwärmt und für 16 h gerührt.

Die Boc-geschützten Dextran-Aminosäureester wurden anschließend in Wasser ausgefällt. Durch das Vorliegen der Boc-Gruppe, deren unpolarer Charakter durch die Methylgruppen zustande kommt, sind die Dextranester wasserunlöslich. Dafür sind sie löslich in unpolareren organischen Lösungsmitteln. In Abhängigkeit vom erreichten DS-Wert sind die Proben i.a. in Ethylacetat und Dioxan löslich. Ester mit geringeren DS-Werten sind noch löslich in Methanol, in Wasser jedoch keine der Proben. Durch zunehmende Substitution verliert das Polymerrückgrat an Einfluß auf die Lösungseigenschaften des Polymers und der hydrophobe Charakter der Boc-Gruppe bestimmt die Löslichkeit, so daß man von einer Umpolung der Lösungseigenschaften des Polymers sprechen kann.

Von den erhaltenen Dextran-Aminosäureestern wurden nach Trocknung im Trockenschrank bzw. Gefriertrocknung NMR-Spektren angefertigt. In Abbildung 3.2 finden sich das Spektrum eines Dextran- β -Alaninesters mit $\text{DS}=1,5$, sowie die Zuordnung der Signale. Man sieht deutlich, daß das Signal von C1 fast komplett von 98,4 ppm auf 95,2 ppm verschoben ist. Dies hängt mit der Veresterung an Position C2 zusammen, da durch die Reaktion an dieser Position die elektronische Umgebung für Position 1 ebenfalls verändert wird. Die Reaktion läuft dabei vorwiegend an Position 2 ab^[65], bei $\text{DS}>1$ sind die Positionen 3 und 4 ebenfalls teilweise verestert, was auch an der Aufspaltung des Signals von C7 zu erkennen ist. Reste von Imidazol (Signale bei 121,1 ppm und 136,6 ppm), bedingt durch den Reaktionsmechanismus, sind häufig durch Waschen mit Wasser nicht komplett zu entfernen. Demgegenüber erlaubt das Waschen mit Wasser die Zerstörung von verbliebenen Spuren des reaktiven CDI.^[93]

Das Ausmaß der Veresterung wird durch den DS-Wert angegeben. Für Dextran mit drei freien OH-Gruppen ist der maximale $\text{DS}_{\text{max}}=3$, wenn alle Hydroxylgruppen zum Ester reagiert haben. Die erhaltenen Boc-geschützten Ester enthalten auch nach Trocknung bei größeren Ansätzen noch Wasser und mitunter DMSO, was die Bestimmung des DS-



*Carbonylkohlenstoff der Säure, *2Imidazol

Abbildung 3.2: ^{13}C -NMR-Spektrum eines Boc-geschützten β -Alaninesters (aufgenommen in DMSO-d_6)

Wertes mittels Elementaranalyse gerade bei höheren Molverhältnissen unmöglich werden läßt. Zur Bestimmung wurden stattdessen Peracetylierungen bzw. Perpropionylierungen an den Proben durchgeführt. Dabei werden die in der Synthese nicht veresterten Hydroxylgruppen zum Essig- bzw. Propionsäureester umgesetzt. Aus den resultierenden NMR-Spektren lassen sich über Integration der Signale die DS-Werte für beide Substituenten bestimmen.

Die Methode der Peracetylierung/-propionylierung ist in der Analytik von Polysaccharidderivaten etabliert.^[67] Dennoch sollte der Erfolg, d.h. die vollständige Veresterung der Hydroxylgruppen, stets überprüft werden. Wenn im FTIR-Spektrum der peracetylierten/perpropionylierten Probe kein Signal für die OH-Valenzschwingung ν_{OH} im Bereich von $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ zu finden ist, kann von vollständiger Veresterung der AGE ausgegangen werden. Durch die Veresterung mit Aminosäuren sind im Bereich von $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ weitere Signale durch die N-H-Valenzschwingung ν_{NH} zu erwarten. Die Kontrolle des Erfolgs der Veresterung ist daher erschwert. In Abbildung 3.3 sind die FTIR-Spektren eines Boc-geschützten β -Alaninesters sowie des peracetylierten Esters zu sehen. In Teil a) überlagern sich ν_{OH} und ν_{NH} , in b) ist das verbleibende Signal deutlich schmaler. Im Bereich $3200\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ fehlt die Bande der OH-Valenzschwingung. Der somit belegte

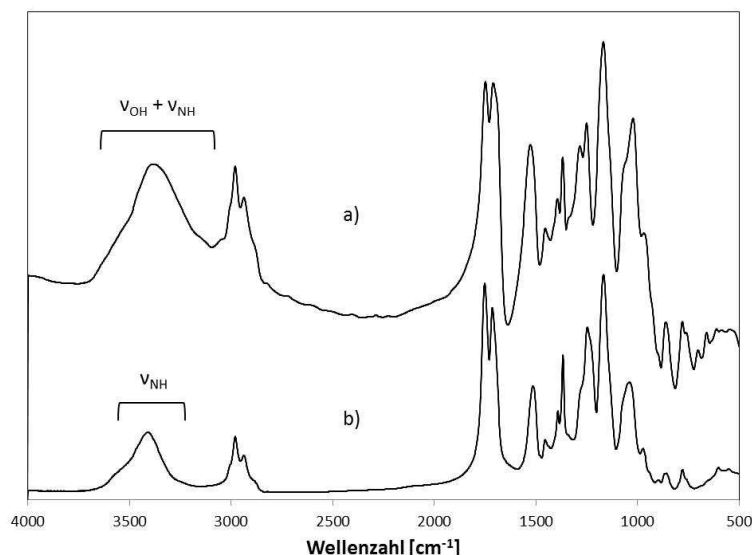


Abbildung 3.3: FTIR-Spektren a) eines Boc-geschützten β -Alaninesters und b) nach Peracetylierung (DS=2,3)

Erfolg der Peracetylierung/Perpropionylierung läßt die Verwendung der so erhaltenen DS-Werte vertretbar erscheinen.

Für Glycin- und β -Alaninester wurden Peracetylierungen durchgeführt, für die L-Lysinester Perpropionylierungen, da für die peracetylierten Proben im ^1H -NMR-Spektrum keine ausreichende Signaltrennung zu erreichen ist. Jede Probe weist so drei Signale auf (s.a. Abbildung 3.4), die voneinander unterschieden werden können, die je nach Art der Probe unterschiedliche Protonen beinhalten. Zur Berechnung der DS-Wertes werden jedoch nur jeweils zwei dieser Signale gebraucht (Abbildung 3.4). Die genaue Zuordnung der Signale zu den Integralen sowie die daraus resultierenden Formeln zur Berechnung des DS-Wertes finden sich in Tabelle 3.1. Die bei der Veresterung erreichten DS-Werte unterscheiden sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Boc-geschützten Aminosäure (s. Tabelle 3.2). Die zwei kleinen, sich nur in einer CH_2 -Gruppe unterscheidenden Aminosäuren Glycin und β -Alanin verhalten sich in der Effizienz der Reaktion in Abhängigkeit vom Molverhältnis AGE:AS ähnlich, d.h. gleiche Molverhältnisse bedingen vergleichbare DS-Werte. Als Höchstwert unter den gewählten Bedingungen ist hier DS=1,9 für Molverhältnisse AGE:AS $\leq 1:3$ zu finden. Bei kleineren Molverhältnissen ist eine Sättigung erreicht. Obwohl DS-Werte von 3 bei Veresterungen von Polysacchariden annähernd erreicht werden können^[111], sind Werte darunter nicht ungewöhnlich, gerade bei vergleichbaren Molverhältnissen.^[108] Für L-Lysin, das eine deutlich höhere Molmasse

Tabelle 3.1: Signalaufteilung und Formel zur Bestimmung des DS aus peracetylierten/perpropionylierten Proben

Aminosäure	\int_1	\int_2	DS
Glycin	AGE(7H; 6,0-3,5ppm) Glycin(2H; 3,5ppm)	Boc(9H; 1,2ppm)	$\frac{7 \int_2}{9 \int_1 - 2 \int_2}$
β -Alanin	AGE(7H; 6,0-3,5ppm) β -Alanin(2H; 3,1ppm)	Boc(9H; 1,2ppm)	$\frac{7 \int_2}{9 \int_1 - 2 \int_2}$
L-Lysin	AGE(7H; 6,0-3,5ppm) L-Lysin(1H; 3,4ppm)	L-Lysin(2H; 2,9ppm)	$\frac{7 \int_2}{2 \int_1 - \int_2}$

v.a. nach dem Schützen mit der Boc-Gruppe hat, sind die Reaktionsraten deutlich geringer, was durch die wesentlich höhere sterische Hinderung bedingt ist. Dadurch resultieren maximale DS-Werte von 1,4, was geringer als die von den Glycin- und β -Alaninestern erreichten 1,9 ist. Auch bei den L-Lysinestern ist eine Sättigung bei AGE:AS = 1:3 erreicht und der DS steigt nicht weiter an, wenn die Säure im Überschuß eingesetzt wird (siehe Abbildung 3.2).

Die Molmassen einer Reihe Boc-geschützter Dextran- β -Alaninester wurden mit Hilfe von SEC auf ihre Molmassen und DP vermessen, worauf in Kapitel 3.1.2 eingegangen wird.

3.1.2 Synthesen durch Aktivierung von Carboxygruppen durch CDI in Imidazol

Der Einsatz von Imidazol bei der Veresterung von Polysacchariden ist seit kurzem bekannt.^[112,113] Die Anwendung von Imidazol ermöglicht die Synthese von Produkten mit hohen DS-Werten. Außerdem hat Imidazol Einfluß auf die Regiochemie der Produkte.^[113] Imidazol wirkt in diesen Beispielen als Lösungsmittel, Base und Reagenz zur Aktivierung des Carbonylkohlenstoffs der eingesetzten Säuren.

Die Aktivierung des Carbonylkohlenstoffs als Vorbedingung zur Veresterung erfolgt laut Literatur durch das Einsetzen der wesentlich reaktiveren Säurechloride.^[112,113] Obwohl

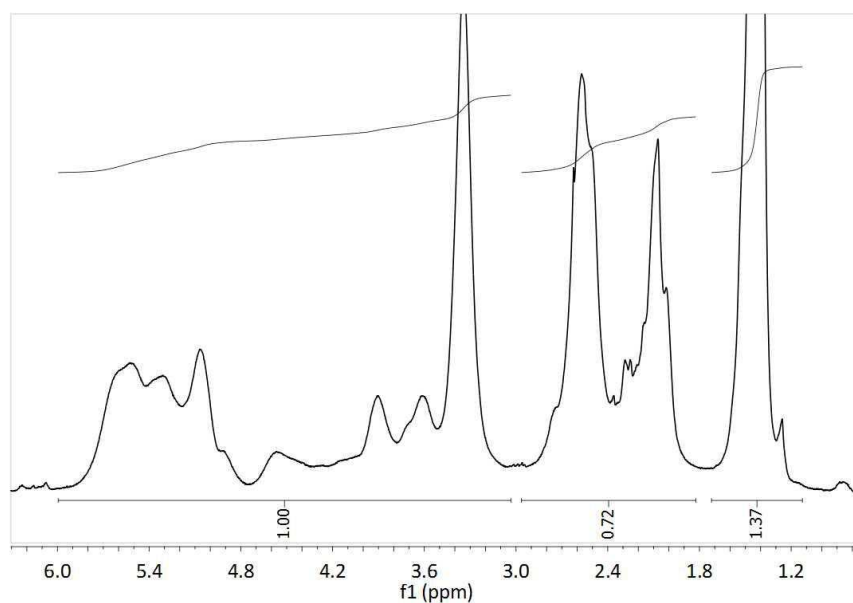


Abbildung 3.4: ^1H -NMR-Spektrum eines peracetylierten β -Alaninesters mit $\text{DS}_{\beta\text{-Alanin}} = 1,5$

Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen und DS-Werte der resultierenden Ester nach Synthese in DMSO (80°C, 16 h) unter Aktivierung mit CDI

Probe	Aminosäure	Molverhältnis AGE:AS:CDI	DS
1a	Glycin	1:1:1	0,8
1b	Glycin	1:2:2	1,1
1c	Glycin	1:3:3	1,9
1d	Glycin	1:4:4	1,9
2a	β -Alanin	1:1:1	0,7
2b	β -Alanin	1:2:2	1,2
2c	β -Alanin	1:3:3	1,9
2d	β -Alanin	1:4:4	1,9
3a	L-Lysin	1:1:1	0,3
3b	L-Lysin	1:2:2	0,9
3c	L-Lysin	1:3:3	1,4
3d	L-Lysin	1:4:4	1,3

die Bildung von Aminosäurechloriden bekannt ist^[114], stellt sie einen weiteren synthetischen Schritt dar, der durch *in situ*-Aktivierung mit CDI vermieden wird. Bei der Kombination der Aktivierung des Carbonsäurechlorids mit CDI und Imidazol als Lösungsmittel entstehen als Nebenprodukte lediglich das gasförmige CO₂ sowie das Lösungsmittel Imidazol, das leicht wegen seiner Löslichkeit in allen gängigen Lösungsmitteln vom Produkt getrennt werden kann.

Auf diese Art wurden Boc-geschützte Ester der strukturell verschiedenen Aminosäuren β -Alanin und L-Lysin synthetisiert. Dazu wurde zuerst Imidazol bei 120 °C geschmolzen, danach wurden zur Bildung des Imidazolid die Boc-geschützte Säure und CDI zugegeben. Um die Vernetzung gemäß Abbildung 2.6 zu vermeiden, wurde erst nach beendeter Aktivierungsreaktion Dextran bei gleichzeitigem Absenken der Reaktionstemperatur auf 100 °C zugegeben und die Reaktionsmischung gerührt. Die Produkte wurden in Wasser ausgefällt und anschließend im Trockenschrank getrocknet. Die Produkte unterscheiden sich spektroskopisch und in ihrer Löslichkeit nicht von den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Proben. Allerdings sind die Proben **5c** und **5d** in organischen Lösungsmitteln nicht mehr komplett löslich.

Die Molverhältnisse (AGE:AS) wurden variiert und die resultierenden Ester anschließend perpropionyliert. Mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektren wurden, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, der DS-Wert bestimmt (Tabelle 3.3). Die Trends bei der Synthese, die in Kapitel für die Synthese in CDI/DMSO festgestellt wurden, sind gleich. Die kleinere Aminosäure β -Alanin reagiert in größerem Umfang, als das sterisch gehemmtere, größere L-Lysin. Beim Molverhältnis AGE: β -Alanin=1:4 ist der maximale DS von 1,5 erreicht. Eine Steigerung des Molverhältnisses auf 1:6 hat keinen Effekt auf den DS, es sinkt so lediglich die Effektivität der Reaktion. Ein ähnliches Verhalten findet man bei der Veresterung mit Boc-geschütztem L-Lysin, hier ist der maximale DS_{max}=1,0 bereits beim Molverhältnis 1:3 erreicht und stagniert dann. Insgesamt sind die DS-Werte, verglichen mit denen für die Synthese mit CDI in DMSO (Tabelle 3.2), etwas geringer. Durch den Mechanismus der Aktivierung wird zwar durch das permanente Entfernen von CO₂ das Gleichgewicht auf die Seite der aktivierten Säure verschoben, bleibt dort aber mit fortschreitender Veresterung stehen, da weiteres CDI die Reaktion zum Erliegen bringt, da es in Form des Lösungsmittels bereits in großem Maße vorliegt. Das Säureimidazolid wird anschließend beim Ausfällen des Polymers in Wasser zur Säure und Imidazol hydrolysiert. Die Unterschiede der DS-Werte in Abhängigkeit vom Lösungsmittel werden in der Literatur durch Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit den verschiedenen Hydroxylgruppen erklärt, die beispielsweise durch Wasserstoffbrückenbindungen die Azidität der Hydroxylgruppen

Tabelle 3.3: DS-Werte, bestimmt durch ^1H -NMR-Spektroskopie nach Perpropionylierung, sowie DP_w - und PDI-Werte der in Imidazol synthetisierten Boc-geschützten Ester

Probe	AS	Molverhältnis AGE:AS	DS	DP_w	PDI
4a	β -Alanin	1:1	0,6	217	2,9
4b	β -Alanin	1:2	1,0	552	3,2
4c	β -Alanin	1:3	1,4	310	2,5
4d	β -Alanin	1:4	1,5	193	1,9
4e	β -Alanin	1:6	1,4	330	2,8
5a	L-Lysin	1:1	0,4	568	3,4
5b	L-Lysin	1:2	0,5	498	3,1
5c	L-Lysin	1:3	1,0	225	2,5
5c ¹	L-Lysin	1:3	1,0	139	1,7
5c ²	L-Lysin	1:3	1,0	98	1,7
5d	L-Lysin	1:4	0,8	137	1,8
6a ³	β -Alanin	1:2	0,8	336	2,5
6b ³	β -Alanin	1:3	0,8	121	2,1
6c ³	β -Alanin	1:4	1,3	119	2,3

¹ nach Zugabe von Harnstoff und Lagerung für 24 h, ² nach Zugabe von NaSCN und Lagerung für 24 h, ³ synthetisiert in DMSO, Aktivierung mit CDI

verstärken und somit die Reaktion begünstigen.^[113]

Die Fähigkeit von Imidazol, Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen, ist bekannt^[115] und wird in verschiedenen biologischen Prozessen beobachtet, beispielsweise bei der Faltung von Eiweißen.^[116] Das Gleiche gilt für Carbamate, die ebenfalls in der Lage sind, über $\text{NH}\rightarrow\text{O}$ -Bindungen Wasserstoffbrücken aufzubauen.^[117] Mit Hilfe der SEC wurden die Polymerisationsgrade (DP_w) der Proben **4a-e** und **5a-d** bestimmt. Zum Vergleich wurden die Proben **6a-c** herangezogen, die in DMSO unter CDI-Aktivierung synthetisiert wurden (Tabelle 3.3).

Bei den mit SEC ermittelten Molmassen handelt es sich nicht um absolute Werte, was seinen Grund darin hat, daß die SEC eine Relativmethode ist. Grundsätzlich eignet sich die SEC zur Molmassenbestimmung von neutralen Polymeren, die Werte sind aber nur so gut, wie die eingesetzten Standards dies zulassen. Zur Messung der Proben wurden Pullulanstandards verwendet, die sich strukturell von den gemessenen Proben unter-

scheiden.^[118] Dieser systematische Fehler geht jedoch in alle Messungen ein, was den Vergleich ähnlicher Proben untereinander in einem gewissen Rahmen bei gleichen Meßbedingungen erlaubt. Dabei ist zu beachten, daß auch veränderte DS-Werte und die Art des Substituenten das hydrodynamische Volumen und damit die resultierenden Molmassen (M_w) beeinflussen können. Aus den gewonnenen M_w -Werten wurde mit Hilfe des DS und der molaren Masse der substituierten AGE der durchschnittliche Polymerisierungsgrad (DP_w) errechnet:

$$DP_w = M_w / (M_{AGE} + DS \cdot M_{Substituent})$$

$M_{Substituent}$ beinhaltet die Veränderungen der Molmasse infolge der Substitution an AGE (abzüglich ein Proton) sowie an der Aminosäure (abzüglich ein Proton und ein Sauerstoffatom). Der DP_w -Wert wurde herangezogen, um die Polymere **4.*** und **6.*** untereinander zu vergleichen, da aufgrund der unterschiedlichen DS-Werte die Molmassen und Elutionsvolumina nicht aussagekräftig sind. Der DP-Wert bezieht diesen Unterschied der Polymere untereinander ein und erlaubt es so, die Proben zu vergleichen, ohne daß Absolutwerte nötig sind.

Es fällt auf, daß die in DMSO synthetisierten Proben **6a-c** im Durchschnitt gegenüber den Boc-geschützten β -Alaninestern **5a-e**, die in Imidazol synthetisiert wurden, einen geringeren DP-Wert aufweisen. Der Unterschied liegt im verwendeten Lösungsmittel. Durch die Verwendung von Imidazol kann dieses, neben dem als Nebenprodukt aus dem CDI gebildeten, zur Bildung von Aggregaten der Polymere durch Stabilisierung von Wasserstoffbrückenbindungen beitragen. Durch die höhere Konzentration von Imidazol bei der Synthese von **4a-e** ist dieses in größerem Ausmaß möglich und erklärt die höheren DP_w -Werte bei an sich gleichartigen Polymeren. Diese These wird auch durch die Eigenschaften der Boc-geschützten L-Lysinester **5a-d** belegt. Diese haben pro substituierter Aminosäure zwei Carbamatgruppen, die einerseits untereinander als auch durch Imidazol vermittelt Wasserstoffbrücken ausbilden können. Entsprechend weisen die Proben **5a** und **5b** auch DP_w -Werte auf, die größer sind als $DP_{w,0}$, sowie allgemein höhere PDI. Mit steigenden DS-Werten ist diese Aggregation so stark, daß die Proben **5c** und **5d** nicht mehr vollständig gelöst werden können und nur die lösliche Fraktion vermessen werden kann, was die niedrigen DP_w -werte dieser Proben erklärt.

Daß die vergleichsweise höheren DP_w -Werte der in Imidazol synthetisierten Boc-geschützten Dextran-Aminosäureester auf Imidazol vermittelte und stabilisierte Aggregate zurückgehen, wurde beispielhaft an Probe **5c** belegt. Die Probe wurde nach der Zugabe von zwei Spatelspitzen Harnstoff bzw. Natriumthiocyanat unter den gleichen Bedingungen nach 24

stündiger Lagerung nochmals mit Hilfe der SEC vermessen. Harnstoff ist ein bekanntes Chaotrop, also eine Verbindung, die in der Lage ist, Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen zu brechen und diese so in eine lösliche Form zu überführen. Die genauen Mechanismen dazu sind noch nicht geklärt.^[119] Thiocyanat ist als Teil der Hofmeisterreihe^[120,121], einer Reihe von Ionen, die nach ihrer Wasserstoffbrückenbindungen-fördernden bzw. -zerstörenden Wirkung sortiert sind, ebenfalls ein stark Wasserstoffbrückenbindungen-störendes Reagenz. In Tabelle 3.3 sind die resultierenden DP_w -Werte aufgeführt. Bei beiden Zusätzen sinkt der erhaltene Polymerisationsgrad DP_w . Die Wirkung ist für Thiocyanat wesentlich ausgeprägter, so daß der DP_w auf unter die Hälfte desjenigen ohne Zusätze sinkt. Auch hier können die erhaltenen Werte nicht als Absolutwerte genommen werden, sie zeigen aber einen klaren Trend in ihrer Absenkung von DP_w auf ca. 50 %. Wasserstoffbrückenbindungen werden durch beide Reagenzien gestört, die hohen DP_w -Werte für die Veresterung mit CDI in Imidazol im Vergleich zur Veresterung mit CDI in DMSO sind als Folge der verbrückenden Eigenschaften von Imidazol erklärbar.

3.1.3 Synthesen mit DMF/Oxalylchlorid in LiCl/DMAc

Die *in situ*-Aktivierung von Carbonsäuren mit Iminiumchloriden stellt eine weitere milde Methode dar, Polysaccharide zu verestern. Die erhaltenen Produkte zeichnen sich durch eine hohe Reinheit aus^[108], was v.a. für medizinische Anwendungen einen großen Vorteil darstellt. Bei der Reaktion wird das Lösungsmittel DMF mit einem Chlorierungsreagenz in einer der Bildung des Vilsmeier-Reagenz analogen Reaktion umgesetzt. Wird dabei Oxalylchlorid eingesetzt, entstehen lediglich Gase, die aus der Reaktionslösung leicht entfernbar sind, und DMF wird rückgebildet. Nebenreaktionen sind nicht bekannt.^[93] Es formt sich im ersten Schritt das Iminiumchlorid *in situ*, aus dem sich mit der Säure ein 1-Carboxy-Iminium bildet, dessen reaktiver Carbonylkohlenstoff mit den Hydroxygruppen des Polysaccharides reagiert und so der Ester entsteht.^[7] Die Reaktion ist unter milden Bedingungen durchzuführen. Die Bildung des Iminiumchlorids läuft innerhalb einer Stunde in einem Temperaturbereich von ≤ -20 °C ab, die eigentliche Veresterung nach Zutropfen zum in LiCl/DMAc gelösten Dextran bei 60 °C innerhalb von 16 Stunden.^[108] LiCl/DMAc ist ein Mehrkomponentengemisch, das in der Lage ist, eine große Anzahl von Polysacchariden, z.B. Cellulose, Chitin, Chitosan, Amylose und Amylopectin, zu lösen.^[122] Gleichzeitig wird der Abbau des Polymers in diesem Lösungsmittelgemisch mit 15 % als sehr gering eingeschätzt, sogar für hochmolekulare Polysaccharide.^[7,93] Die auf diesem Weg erhaltenen Produkte sind spektroskopisch den in den Kapiteln 3.1.1 und

3.1.2 beschriebenen identisch. Ihr Lösungsverhalten ist anders: trotz der Substitution mit hydrophoben Boc-geschützten Aminogruppen sind die erhaltenen Ester wasserlöslich. Die Umsetzung von L-Lysin mit Iminiumchlorid zum Ester funktioniert hingegen überhaupt nicht. Dies zeigte sich in der Elementaranalyse, bei der kein Stickstoff in den erhaltenen Produkten enthalten war. Da die *in situ*-Aktivierung von Carbonsäuren mit Iminiumchlorid sehr effektiv ist^[7,108], ist der Grund im Vorhandensein der geschützten α -Aminofunktion zu suchen. Der Carbonylkohlenstoff der Boc-geschützten Aminosäure L-Lysin hat im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 100 MHz eine Verschiebung in Chloroform von 176,4 ppm^[123], wohingegen der Carbonylkohlenstoff des Aminogruppen-freien Analogons Hexansäure eine Verschiebung von 180,2 ppm aufweist.^[124] Dies bedeutet, daß durch die räumliche Nähe der zwei Gruppen, Carboxyl- und Boc-geschützter Aminofunktion, der Elektronenmangel der Carbonsäure größer ist als an der analogen Boc-geschützten Aminosäure. Für die Aktivierung bedeutet das, daß ein Teil des Elektronenzugs vom Carbonylkohlenstoff zum Stickstoff des Iminiums hin durch die Elektronendichte der Boc-geschützten Aminogruppe ausgeglichen wird und so das Elektrophil nicht mehr stark genug ist für die Veresterungsreaktion.

Der gleiche Effekt zeigt sich bei β -Alanin. Hier ist jedoch aufgrund der β -Position der Boc-geschützten Aminofunktion der elektronische Ausgleich zwischen den funktionellen Gruppen nicht vergleichbar stark. Die Verschiebung des Carbonylkohlenstoffs liegt hier bei 178,0 ppm^[125], die von Propionsäure bei 181,1 ppm.^[126] Dadurch kann ein Teil der Säure nach Aktivierung zum Ester reagieren, jedoch nur zu Produkten mit geringem DS (Tabelle 3.4).

Die Molmassen M_w und daraus resultierend die Polymerisationsgrade DP_w wurden mit SEC unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben gemessen. Durch die Abwesenheit von Imidazol oder anderen Wasserstoffbrücken-bildenden Molekülen sind die errechneten DP im Durchschnitt deutlich niedriger als bei der Aktivierung mit CDI, bei der Imidazol als Nebenprodukt mit anfällt. Der Abbau des Polymerrückgrates ist bei dieser Art der Aktivierung relativ groß, was die DP_w -Werte von Probe **7a** und **7c** nahelegen.

Aufgrund der Verwendung von Pullulanstandards sind diese Werte trotzdem kritisch zu bewerten, zeigen aber einen Trend auf, der auch durch die Löslichkeit der Produkte in Wasser zumindest bestätigt wird, wobei auch der niedrige DS eine Rolle spielen kann. Die Mildheit zumindest des Lösungsmittel bezogen auf den Polymerabbau wird in der Literatur hervorgehoben^[7], jedoch nicht konkret belegt.^[7,112] Insgesamt ist die Aktivierung von Boc-geschütztem L-Lysin und β -Alanin, und daraus resultierend anderer α -

Tabelle 3.4: DS-, DP_w - und PDI-Werte der in LiCl/DMAc mit Oxalylchlorid/DMF aktivierten Boc-geschützten Ester

Probe	AS	Molverhältnis AGE:AS	DS	DP_w	PDI
7a	β -Alanin	1:2	0,1	69	1,7
7b	β -Alanin	1:3	0,3	106	1,9
7c	β -Alanin	1:4	0,2	57	2,1
7d	β -Alanin	1:6	0,2	252	3,7

und β -Aminosäuren, zur Veresterung mit Polysacchariden nicht geeignet.

3.2 Synthese von Dextran-Aminosäureestern

3.2.1 Abspalten der Boc-Gruppe

Bei den in Kapitel 3.1 hergestellten Boc-geschützten Dextran-Aminosäureester müssen für ihre Verwendung im Gentransfer die Aminogruppen freigesetzt werden. Dazu wird die Carbamatbindung der Boc-Gruppe bei leicht saurem pH-Wert abgespalten. Das Standardverfahren ist dabei die Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) in verschiedenen Lösungsmitteln und mit verschiedenen Volumenanteilen.^[127–129] Außerdem werden gesättigte Lösungen von HCl in Ethylacetat^[130,131] oder auch Schwefelsäure in verschiedenen Lösungsmitteln^[132,133] zum Entfernen der Boc-Gruppe genutzt. Houghten *et al.* kommen mit 10 % Schwefelsäure in 1,4-Dioxan auf vergleichbare Ergebnisse wie mit 50%iger TFA in CH_2Cl_2 .^[132] Die Entfernung der Boc-Gruppe funktioniert immer gut, jedoch wird sie vorwiegend bei niedermolekularen Verbindungen eingesetzt. An einem Polymer ist die vollständige Entschützung nötig, um einheitliche Homoester mit lediglich einem Substituenten zu erhalten. Es wurden drei Reaktionsbedingungen für das Abspalten der Schutzgruppe der Boc-geschützten Dextran-Aminosäureester gewählt:

- gesättigte HCl-Lösung in 1,4-Dioxan^[131],
- 10 % Schwefelsäure in 1,4-Dioxan^[132] und
- 50 % TFA in CH_2Cl_2 .^[132]

Die Produkte wurden in Diethylether ausgefällt, gewaschen, gegen Wasser dialysiert

Tabelle 3.5: DS- und DPr-Werte der entschützten Dextran-Aminosäureester

Ausgangs- ester	Säure	Probe	Elementar- analyse [%]			DS	DPr [%]
			N	S	Cl		
1a	HCl _(g)	8.1a	3,55	-	7,80	0,53	87
1a	H ₂ SO ₄	8.2a	3,37	3,97	-	0,53	102
1a	TFA	8.3a	3,16	-	5,40	0,45	67
1b	HCl _(g)	8.1b	4,13	-	9,24	0,65	89
1b	H ₂ SO ₄	8.2b	4,54	5,10	0,36	0,78	103
1b	TFA	8.3b	4,11	-	4,71	0,61	46
1c	HCl _(g)	8.1c	7,15	-	16,31	1,54	90
1c	H ₂ SO ₄	8.2c	6,58	7,25	-	1,49	97
1c	TFA	8.3c	6,22	-	8,08	1,08	52
2a	HCl _(g)	9.1a	2,60	-	5,13	0,37	78
2a	H ₂ SO ₄	9.2a	3,02	3,38	0,76	0,48	106
2a	TFA	9.3a	3,14	-	5,52	0,46	70
2b	H ₂ SO ₄	9.2b	4,62	5,43	0,34	0,90	106
2b	TFA	9.3b	3,63	-	3,01	0,54	31
2c	HCl _(g)	9.1c	4,82	-	11,25	0,87	92
2c	H ₂ SO ₄	9.2c	4,97	5,43	-	0,99	95
2c	TFA	9.3c	3,96	-	5,02	0,61	51
2d	H ₂ SO ₄	9.2d	5,35	5,85	-	1,13	96
2d	TFA	9.3d	4,31	-	5,83	0,69	54
3a	HCl _(g)	10.1a	1,53	-	2,96	0,10	80
3a	H ₂ SO ₄	10.2a	2,52	2,93	-	0,18	106
3a	TFA	10.3a	2,60	-	5,13	0,18	78
3b	HCl _(g)	10.1b	2,50	-	5,21	0,17	88
3b	H ₂ SO ₄	10.2b	5,93	6,38	-	0,64	95
3b	TFA	10.3b	4,08	-	5,48	0,31	55
3c	HCl _(g)	10.1c	5,00	-	5,42	0,40	45
3c	H ₂ SO ₄	10.2c	7,77	8,84	-	1,20	100
3c	TFA	10.3c	5,44	-	4,88	0,45	36
3d	HCl _(g)	10.1d	5,66	-	13,40	0,54	104
3d	H ₂ SO ₄	10.2d	7,52	7,98	-	1,06	93
3d	TFA	10.3d	6,93	-	12,48	0,72	79

und gefriergetrocknet. Als Ausgangsstoffe wurden die in Kapitel 3.1.1 hergestellten Boc-geschützten Dextran-Aminosäureester genutzt. Die Produkte wurden mit NMR-Spektroskopie, Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AF4), Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) und Elementaranalyse (EA) analysiert und die Auswirkungen unterschiedlicher Reaktionsbedingungen untersucht.

Zur Herstellung der Dextran-Aminosäureester wurden die Proben **1a-d**, **2a-d** und **3a-d** verwendet (s. Tabelle 3.2). Die Säuren wurden im Überschuß eingesetzt, nachdem die Boc-geschützten Ester sich gelöst hatten. Als Zeitdauer der Reaktion wurden 30 Minuten ausgewählt. Die erhaltenen Produkte sind löslich in Wasser und unlöslich in organischen Lösungsmitteln, was der Umkehrung der Umpolung aus Kapitel 3.1 entspricht, da die Entfernung der unpolaren Boc-Gruppe die polare, protonierte Aminogruppe freisetzt.

Unter den Bedingungen des Entfernens der Boc-Gruppe von den Aminogruppen ist auch ein Verlust an Esterbindungen der Aminosäuren zum Dextran zu erwarten. Dieser Verlust an Funktionalität wird durch den Vergleich der DS vor und nach der Reaktion beschrieben. Die Peracetylierungen/Perpropionylierungen der entschützten Ester ergeben keine brauchbaren Ergebnisse, da die ungeschützten NH₂-Gruppen zum Amid mitreagieren. Diese Reaktion findet aber nicht vollständig statt, was die Ergebnisse unauswertbar macht. Durch Dialyse und Gefriertrocknung erhält man reine Substanzen, deren DS-Werte mit Hilfe der Elementaranalyse bestimmt werden können (Tabelle 3.5). Die Berechnung erfolgt gemäß den folgenden Formeln:

$$DS_1 \cdot (b - B \cdot \frac{N\%}{100}) + DS_2 \cdot (-C \cdot \frac{N\%}{100}) = A \cdot \frac{N\%}{100}$$

und

$$DS_1 \cdot (f - B \cdot \frac{S\%}{100}) + DS_2 \cdot (-C \cdot \frac{S\%}{100}) = A \cdot \frac{S\%}{100},$$

wobei A die Molmasse der AGE, B die Molmasse der substituierten Aminosäure und C die Molmasse von Schwefelsäure sind. Desweiteren sind b die Molmasse von Stickstoff im Aminosäuresubstituenten und f die Molmasse von Schwefel in Schwefelsäure. Durch Umstellen nach DS₁ und DS₂ löst man das Gleichungssystem und erhält die DS-Werte. Für die Glycinester liegen die DS-Werte zwischen 0,45 und 1,54 (**8.*a-c**), für β -Alaninester zwischen 0,37 und 1,13 (**9.*a-d**) und für L-Lysinester zwischen 0,10 und 1,20 (**10.*a-d**). Vergleicht man die DS-Werte der Boc-geschützten (s. Tabelle 3.2) mit denen der entschützten Aminosäureester, stellt man fest, daß der Verlust an Substituenten für Glycinester geringer ausfällt als für die β -Alaninester. Dieser Trend ist auffälliger, je höher der DS-Wert des Boc-geschützten Polymers ist. Entschützen der Boc₂-L-Lysinester führt

bei Verwendung von TFA und $\text{HCl}_{(g)}$ unter den gewählten Bedingungen zu sehr niedrigen DS-Werten ($0,10 \leq \text{DS} \leq 0,72$), wohingegen die Verwendung von H_2SO_4 einen sehr geringen Verlust an Funktionalität bedingt, so daß die DS-Werte vergleichbar und sogar höher sind. Das Ergebnis ist für die Glycin- und β -Alaninester ähnlich, wenn auch mit höheren Verlusten bei den β -Alaninderivaten verbunden. Im Sinne des Erzielens eines hohen DS-Wertes ist 10 %ige H_2SO_4 in 1,4-Dioxan von den drei Reaktionsbedingungen vorzuziehen.

Infolge der Abspaltung der Boc-Gruppe bei sauren pH-Werten liegen die Aminogruppen hauptsächlich protoniert als Ammoniumgruppen vor. Der genaue Anteil wird als durchschnittlicher Protonierungsgrad (DPr) ausgedrückt (Tabelle 3.5). Der DPr ist der prozentuale Anteil von Ammoniumgruppen bezogen auf alle Aminogruppen. Errechnet wird er als Quotient aus DS der Aminosäure und wegen der Bivalenz von Schwefelsäure dem normalisierten DS des Gegenions. Zur Berechnung wird die Elementaranalyse herangezogen und die Mineralsäure (Ammonium H^+ + Gegenanion) wie ein weiterer Substituent in der Rechnung behandelt. Dabei ist die Zweiwertigkeit von L-Lysin (zwei Aminogruppen) und die von H_2SO_4 einzubeziehen. Gilt $\text{DPr} = 100\%$, liegen alle Aminogruppen protoniert vor. Mit TFA entschützte Proben wurden mit Anionenaustauscher (IR410) behandelt, um Trifluoracetat gegen Chlorid auszutauschen. Die durch Behandlung mit H_2SO_4 erhaltenen Proben zeigen eine vollständige Protonierung, die unter anderen Bedingungen behandelten Proben weisen lediglich teilweise Protonierung auf.

Polysaccharide unterliegen im sauren Milieu der Hydrolyse der glykosidischen Bindung, was den Abbau des Polymerrückgrates zur Folge hat.^[134] Für die Quantifizierung des Abbaus stellen Polyelektrolyten, speziell Polykationen, ein Problem dar. Infolge ihrer Ladung liegen sie nicht wie neutrale Polymere in der Knäuel-Konformationen in Lösung vor, sondern bei niedrigen Ionenstärken in versteifter Form, was die theoretischen Modelle von Methoden wie Viskosimetrie und SEC unanwendbar werden läßt. Desweiteren kann es zum Effekt der *ion exclusion* kommen, bei der wegen der elektrostatischen Abstoßung des Polykations mit dem Säulenmaterial Teile der Probe nicht vermessen werden und so das Ergebnis verfälscht wird.^[118] Zur Abschirmung der Ladungen voneinander ist es möglich, die Ionenstärke mit Elektrolyten wie Natriumchlorid zu erhöhen. Die zugefügten Elektrolyten können das Ergebnis verändern, indem sie Aggregation der Polymere begünstigen, außerdem tolerieren die Meßgeräte nur bestimmte Salzanteile.^[135] Als Relativmethoden benötigen Viskosimetrie und SEC Standards, die bei neuartigen Verbindungen nicht vorliegen. Daher wurden die Molmassen der Proben mit Hilfe von AF4 untersucht, die sich als verlässliche Absolutmethode zur Molmassenbestimmung von

Tabelle 3.6: DP_w und PDI von Dextran-Aminosäureestern nach Entschützen unter verschiedenen Bedingungen bei 25 °C und 25 mM Acetatpuffer/20 mM NaCl-Lösung als Eluent (Ausgangsmaterial Dextran $DP_w \sim 360$, PDI=1,53)

Probe	Entschützt mit	DP_w	PDI
8.1a	HCl	267	1,77
8.1b	HCl	251	1,57
8.1c	HCl	178	2,13
8.2a	H ₂ SO ₄	209	2,16
8.2b	H ₂ SO ₄	208	1,88
8.2c	H ₂ SO ₄	223	2,12
8.3a	TFA	282	1,81
8.3b	TFA	267	1,86
8.3c	TFA	221	1,74
9.2a	H ₂ SO ₄	288	1,89
9.2b	H ₂ SO ₄	208	1,95
9.2c	H ₂ SO ₄	455	2,13
9.2d	H ₂ SO ₄	473	2,30

Polykationen bewährt hat.^[136]

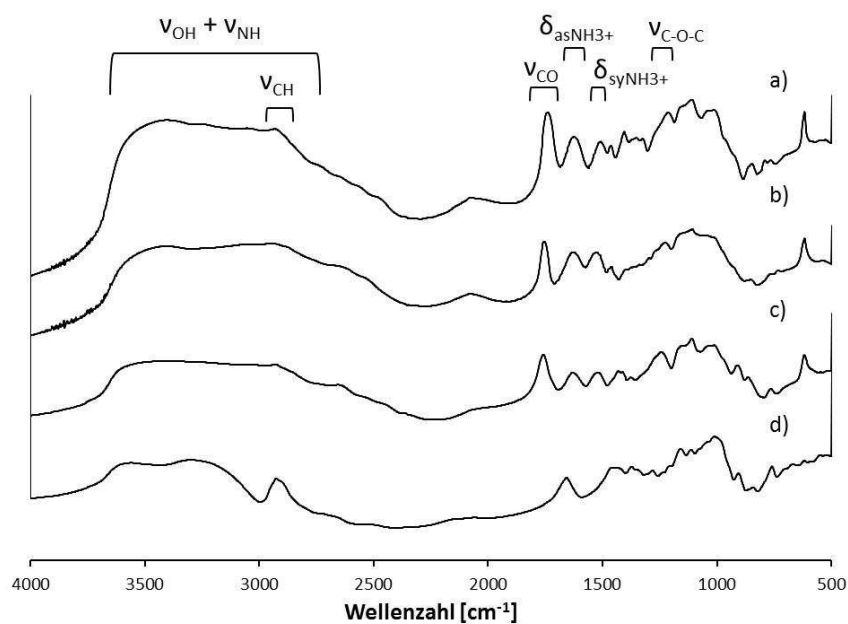
Der Abbau des Polymerrückgrates war am stärksten bei der Behandlung mit 10 %iger H_2SO_4 in 1,4-Dioxan, wohingegen TFA den geringsten Abbau zeigt (Tabelle 3.6). Die Einheitlichkeit der Proben ist nach dem Entschützen am größten für $\text{HCl}_{(g)}$ in 1,4-Dioxan und am geringsten mit 10 %iger H_2SO_4 in 1,4-Dioxan, was durch den PDI belegt wird. Insgesamt steigt der PDI für alle Proben im Vergleich zum Ausgangsmaterial, was an den Reaktionsbedingungen beim Entschützen liegt, die die Hydrolyse der glykosidischen Bindung begünstigen. Am Beispiel der Dextran-Glycinester ist gezeigt, daß der DP_w zwischen ca. 50 % (**8.1c**, $\text{HCl}_{(g)}$) und 80 % (**8.3a**, TFA) des Ausgangsdextrans liegt. Die Ergebnisse für β -Alanin- und L-Lysinester zeigen dieselben Trends, die Ausnahme bilden hier β -Alaninester, die einen $\text{DS} \geq 1$ aufweisen und mit 10 %iger H_2SO_4 in 1,4-Dioxan entschützt wurden. Gründe für diesen scheinbaren Molmassenzuwachs können die bekannte unspezifische Wechselwirkung von Polysaccharidderivaten^[137] oder Wechselwirkungen der Aminogruppen^[138] sein. Die Literatur zeigt, daß bereits der strukturelle Unterschied einer CH_2 -Gruppe zwischen Glycin und β -Alanin ausreicht, die Fähigkeit zur Wechselwirkung eines Moleküls mit einem anderen massiv zu beeinflussen.^[104] Bei steigendem DS resultiert als Gegenion zur Ammoniumgruppe bei den gewählten Bedingungen ein entsprechend höherer Anteil an Sulfat. Sulfat ist ein Ion des Wasserstoffbrückenbindungen-begünstigenden Teils der Hofmeisterreihe^[120,121], was zu entsprechenden Aggregaten höherer Molmasse und Polymerisationsgrade führen kann.

Die Bildung des Esters aus Säure und Polysaccharid mit Aktivierung durch CDI ist nach der Literatur^[5,93] belegt und kann leicht im IR-Spektrum bestätigt werden. Die markante CO-Bande ν_{CO} für Carbonylverbindungen liegt nun deutlich verschoben bei 1758 cm^{-1} (Glycinester), 1754 cm^{-1} (L-Lysinester) und 1739 cm^{-1} statt wie bei den Carboxylgruppen der Säuren im Bereich von $1570\text{--}1595 \text{ cm}^{-1}$.^[139–141] Der Einfluß der α -Aminogruppe ist deutlich zu erkennen, die Unterschiede zwischen α - und β -Aminosäureester betragen zwischen 15 cm^{-1} bzw. 19 cm^{-1} . Weitere Signalzuordnungen finden sich in Tabelle 3.7. Der Bereich $3700\text{--}2500 \text{ cm}^{-1}$ enthält die Signale der OH-Valenzschwingung ν_{OH} der unsubstituierten Hydroxygruppen, der NH-Valenzschwingung $\nu_{\text{NH}_3^+/\text{NH}_2}$, sowie die für das Dextran noch klar erkennbaren CH-Valenzschwingungen ν_{CH} zwischen $3000\text{--}2850 \text{ cm}^{-1}$ (Abbildung 3.5). Die Ammoniumgruppen lassen sich eindeutig über die Signale zwischen $1630\text{--}1620 \text{ cm}^{-1}$ ($\delta_{\text{as}}(-\text{NH}_3^+)$) und $1525\text{--}1515 \text{ cm}^{-1}$ ($\delta_{\text{sy}}(-\text{NH}_3^+)$) belegen.

Um die Proben strukturell detaillierter zu charakterisieren, wurde die ^{13}C -NMR-Spektroskopie herangezogen. Beispielhaft werden β -Alaninester mit verschiedenen DS-Werten diskutiert (siehe Abbildung 3.6). Die Signale der Kohlenstoffatome der unsubstituierten

Tabelle 3.7: Ausgewählte FTIR-Signale von Dextran-Aminosäureestern und ihre Zuordnung

Schwingung	Glycin	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]	β -Alanin	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]	L-Lysin	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]
$\nu_{C=O}$		1758		1739		1754
$\delta_{as}(-NH_3^+)$		1628		1622		1628
$\delta_{sy}(-NH_3^+)$		1524		1519		1524
$\nu_{as}(C-O-C)$		1241		1213		1227
ν_{C-O}		1010		1016		1014


Abbildung 3.5: FTIR-Spektren a) eines β -Alaninesters (**9.2d**), b) eines L-Lysinesters (**10.2d**), c) eines Glycinesters (**8.2c**) und d) eines unsubstituierten Dextrans von *Leuconostoc mesenteroides*, $M_w \sim 60000$ g/mol

AGE sind aus der Literatur^[142] bekannt und können leicht zugeordnet werden (Tabelle 3.8). Der zusätzliche Peak des unsubstituierten Dextrans bei 60,3 ppm ist der unsubstituierten Endgruppe C6' in den Verzweigungen und des Polymerrückgrates zugeordnet. Das verwendete Dextran weist einen Gehalt von ca. 5 % (1→3)-glykosidisch gebundener Oligosaccharide auf.^[68] Das Signal von C6' steht für primäre Hydroxygruppen, die bei der Substitution am reaktivsten sind. Daher verschwindet dieses Signal für alle Dextran-Aminosäureester, auch bei geringem DS. Die Signale des Substituenten β -Alanin finden sich bei 31,1 ppm für den α -Kohlenstoff und bei 34,9 ppm für den β -Kohlenstoff. Der Carbonylkohlenstoff C7 erzeugt zwei Signale, bei 172,4 ppm und 171,0 ppm, die beide im Vergleich zur freien Säure um ca. 6 ppm hochfeldverschoben sind, resultierend aus der Veresterung an den unterschiedlichen Positionen der AGE. Diese Aufspaltung läßt sich bereits für geringe DS-Werte finden (Beispiel b in Abbildung 3.6), womit eine regiospezifische Veresterung nicht stattfindet. Bei steigendem DS-Wert sinkt die relative Intensität der Signale der unsubstituierten AGE im Vergleich zu den Signalen des Substituenten und der substituierten AGE.

Die Molmassen der Produkte belegen, daß noch ein polymeres Rückgrat vorliegt. Um gut aufgelöste Spektren bei 2-dimensionalen NMR-Experimenten zu erhalten, wurde für weitergehende Experimente ein Dextran- β -Alaninester mit einem DS=0,45 und einer Startmolmasse des Dextrans von $M_w=6000$ g/mol hergestellt. Im ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum (Abbildung 3.7) findet man die Wechselwirkungen der Kohlenstoffatome mit den Protonen der substituierten Aminosäure. Der Carbonylkohlenstoff C7 wechselwirkt mit den α -ständigen (2,9 ppm) und β -ständigen (3,3 ppm) Protonen an C8 bzw. C9. Außerdem sind Wechselwirkungen des Polymerrückgrates mit sich selbst festzustellen. Die Wechselwirkung von Rückgrat und Aminosäure ist nur feststellbar durch den Crosspeak von C7 mit dem Proton an C2_s des Polymerrückgrates bei 5,2 ppm. Der Subtitel s zeigt Substitution an der jeweiligen Position an. Durch die Substitution an einer Position wird auch die elektronische Umgebung benachbarter Atome verändert. Im ^1H , ^1H -COSY-Spektrum finden sich daher Crosspeaks des Protons H2_s mit den Protonen der zugehörigen Kohlenstoffatome C1_{C2s} (95,2 ppm) und C3_{C2s} (67,4 ppm) bei 5,24 ppm und 3,82 ppm.

Das Signal des Carbonylkohlenstoffs C7 ist im ^{13}C -NMR-Spektrum zwar gespalten, jedoch gibt es keinen Crosspeak des zweiten Signals mit einem Proton der AGE, was darauf hindeutet, daß die Substitution für diesen DS an anderen Positionen als C2 deutlich geringer ausfällt, so daß die Messung nicht sensibel genug ist. Die Substitution findet also bevorzugt an C2 statt, ist aber nicht regiospezifisch. Die Aufspaltung des Signals des Carbonylkohlenstoffs C7_{C2} geht auf das Vorhandensein bzw. das Fehlen einer Substituti-

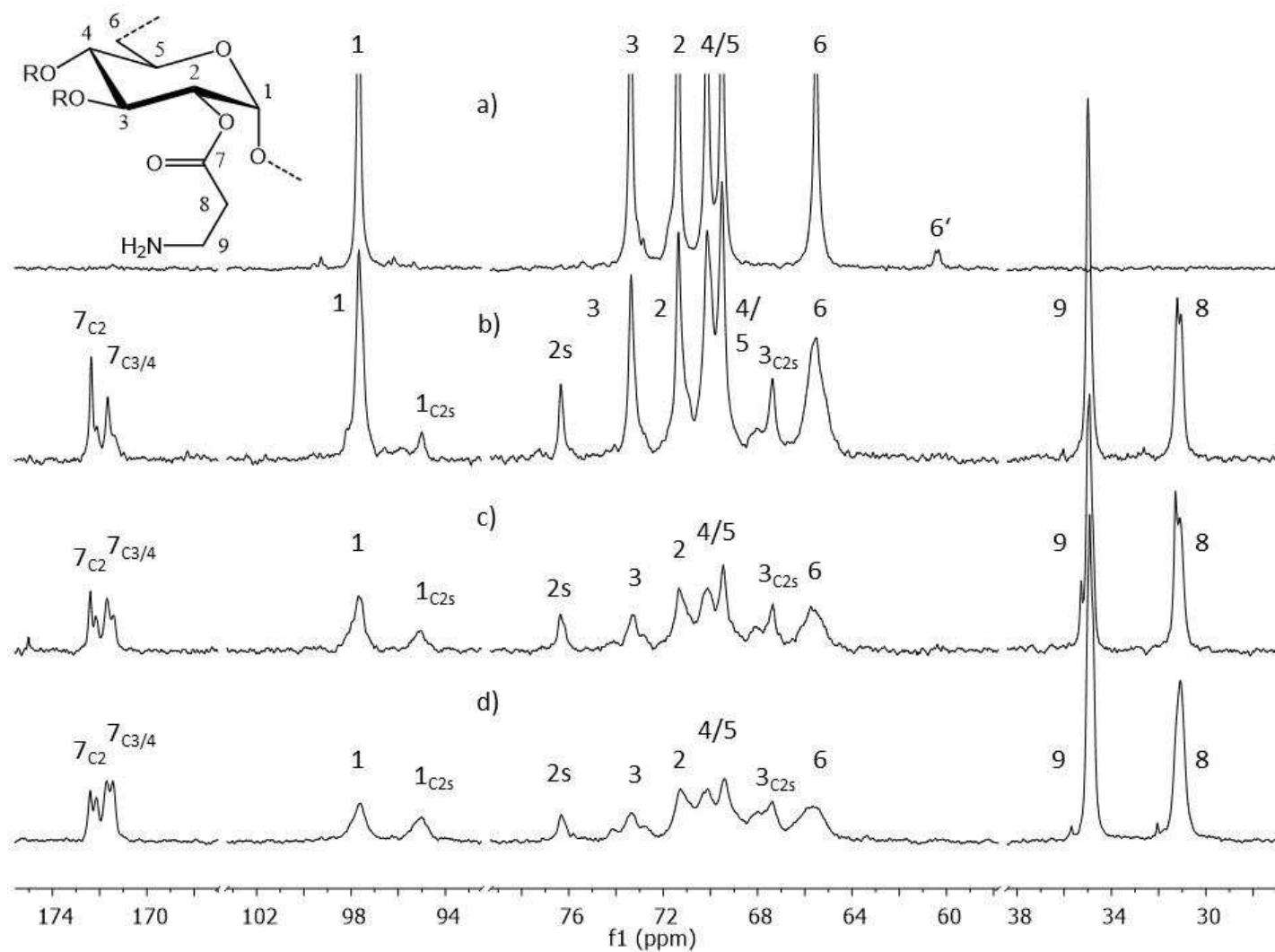


Abbildung 3.6: ^{13}C -NMR-Spektren von a) Dextran und b) Dextran- β -Alaninestern mit DS=0,47 (**9.2a**), c) DS=0,99 (**9.2c**) und d) DS=1,13 (**9.2d**)

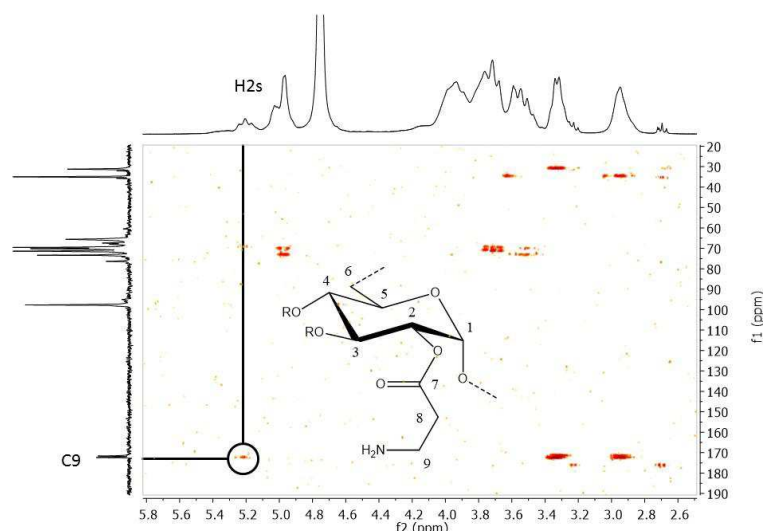


Abbildung 3.7: Nachweis der selektiven Substitution an C2 im ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum eines Dextran- β -Alaninesters (DS=0,45) und einer Molmasse des Ausgangsdextrans $M_w=6000$ g/mol

on an C3 zurück. Für das Signal des ^{13}C -NMR-Spektrums bei 67,9 ppm wurde ebenfalls kein Crosspeak gefunden, aber der Literatur^[143] folgend, ist dies das Signal für ein der substituierten C4 benachbartes C5 (C5_{C4s}). Für C6', das bei Substitution vollständig funktionalisiert wird und daher an Intensität verliert, bis es nicht mehr detektierbar ist, findet sich ein neues sehr schwaches Signal bei 63,4 ppm ($\text{C6}'_s$). Als Beleg dafür dienen die Crosspeaks im ^1H , ^{13}C -HSQC-DEPT-Spektrum, die auf eine CH_2 -Gruppe hinweisen. Verunreinigungen durch freies β -Alanin findet man in einigen Proben bei 175,6 ppm (Carbonylkohlenstoff), 35,5 ppm (β -Position) und 31,8 ppm (α -Position). Die Säure resultiert dabei aus Hydrolyse während der Messungen im sauren Milieu, welches durch die Ammoniumgruppen gepuffert wird. Die Signale der Säure sind zu den entsprechenden Signalen des Esters leicht tieffeldverschoben.

Die erhaltenen Informationen aus den Spektren von β -Alaninestern sind auch zur Aufklärung der ^{13}C -NMR-Spektren der Glycin- und L-Lysinester auf deren Spektren übertragbar und werden nicht detailliert diskutiert. Die Zuordnung der Signale ist in Abbildung 3.8 zu finden. Die Spektren unterscheiden sich lediglich in den Signalen der substituierten Aminosäuren, Signale, die von der AGE erzeugt werden, sind vergleichbar mit denen, die in den β -Alaninestern gefunden wurden. Bemerkenswert ist, daß die Signale der Carbonylkohlenstoffe, die für die Glycinester bei ~ 168 ppm und für die L-

Lysinester bei ~ 170 ppm liegen, leicht hochfeldverschoben vorliegen im Vergleich zu den β -Alaninestern. Ähnlich wie in den FTIR-Spektren zeigt sich hier der Einfluß der α -Aminogruppe, die Elektronendichte zum Carbonylkohlenstoff verschiebt. Für die β -Aminogruppe ist dieser Effekt wegen mangelnder elektronischer Konjugation (vgl. Kapitel 3.1.3 und 3.3) nicht in dem Ausmaß zu finden.

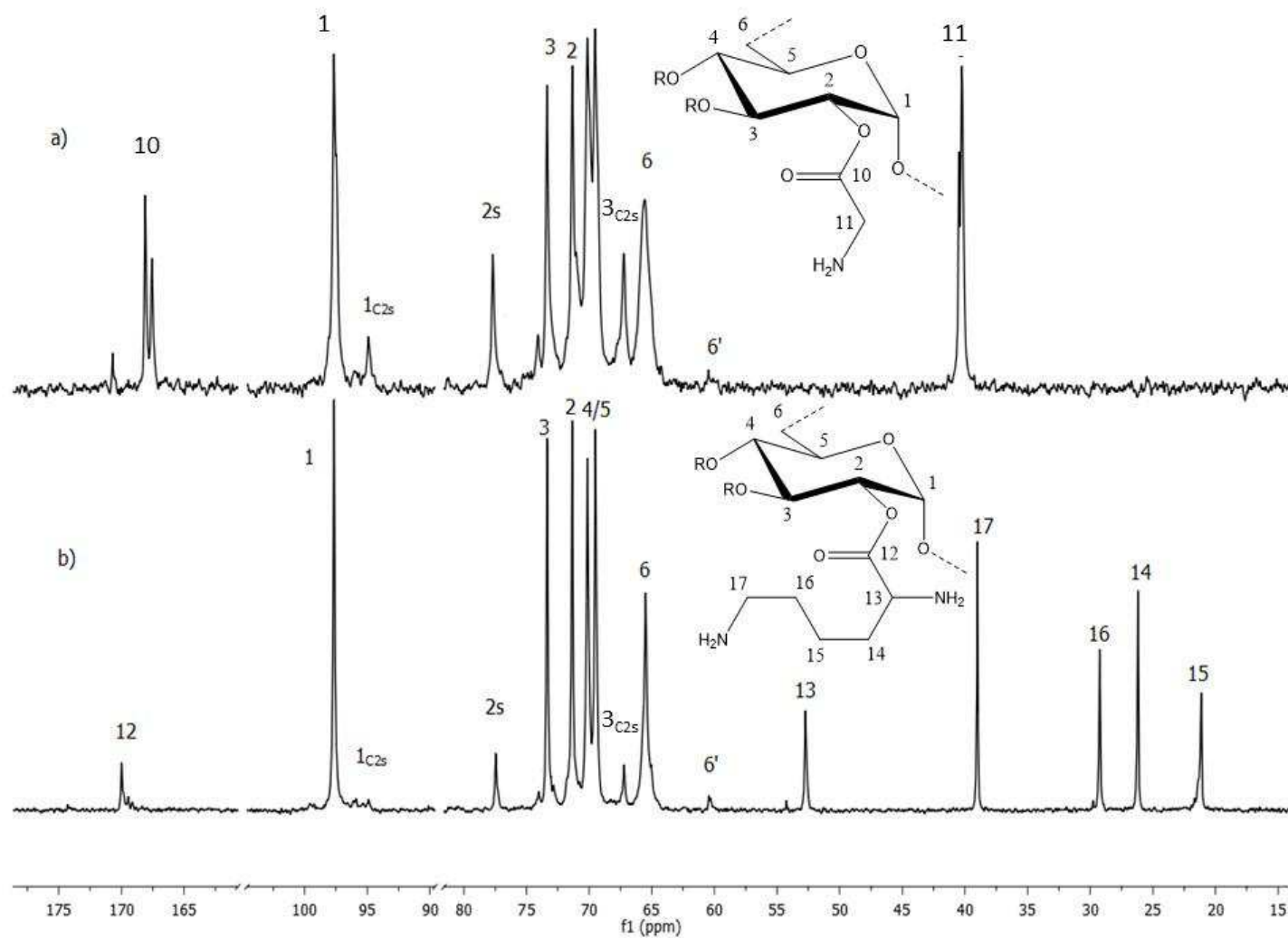
3.3 Protonierungsverhalten und elektrochemische Charakterisierung

Bei erfolgreicher Transfektion ist der Komplex aus Polymer und DNS bzw. RNS von ständigen pH-Wertänderungen begleitet. Der Vektor muß einerseits bei physiologischen pH-Werten ($7,4 \pm 0,05$) stabil sein sowie genügend positive Ladung aufweisen, damit die Wechselwirkungen mit den (poly-)anionischen Nukleinsäuren (RNS, DNS) ausreichend stark bleiben. Mit der elektrochemischen Charakterisierung einer Probe ist außerdem eine Aussage zur Wahrscheinlichkeit des *proton sponge*-Effektes und dessen Rolle im Verlassen des Endosoms durch die Nukleinsäuren möglich. Die verschiedenen Ladungsehalte bei verschiedenen pH-Werten spielen ebenfalls eine Rolle bezüglich der Toxizität sowie der Penetration der Zellwand.^[10,60]

Zusätzlich zu Glycin- (DGE), β -Alanin- (DAE) und L-Lysinestern (DLE) wurde ein L-Ornithinester (DOE) nach der gleichen Vorschrift, wie in den Kapiteln 3.1.1 und 3.2 beschrieben, synthetisiert. Der DS wurde mittels Elementaranalyse bestimmt und liegt bei 0,55. Ornithin ist eine natürliche, als Nebenprodukt im Argininabbau vorkommende Aminosäure und außerdem das um eine CH_2 -Gruppe kürzere Homologe zum L-Lysin. Mit Ornithin substituierte Polymere wie Chitosan^[144] und PEI^[145] wurden bereits für ihre Eignung als Vektoren im Gentransfer untersucht.

Generell ist es sinnvoll, Polymere mit höherem DS bei elektrochemischen Messungen einzusetzen, da so die Stoffmenge an zu titrierenden Aminogruppen je Gewichtseinheit erhöht wird und so die Messungen genauere Ergebnisse erlauben. Daher wurden Dextran-Aminosäureester mit $\text{DS} > 1$ gewählt, lediglich für die Ornithinester konnte keine Probe mit vergleichbarem DS gewonnen werden (Tabelle 3.9).

Das Ladungsverhalten wurde mittels potentiometrischer Titration untersucht. Dazu wurde zunächst die Unabhängigkeit des Ergebnisses von der eingesetzten Masse bzw. der Konzentration bestätigt, indem die Proben bei Konzentrationen von $c \approx 0,3$ mg/mL und $c \approx 0,6$ mg/mL vermessen wurden. Die Isotherme für DGE ist in Abbildung 3.9 zu sehen. Die beiden bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessenen Proben unterschei-



*Carbonylkohlenstoff der Säure

Abbildung 3.8: ^{13}C -NMR-Spektren a) eines Dextran-Glycinesters (DS=0,59) und b) eines Dextran-L-Lysinesters (**10.2a**, DS=0,18)

Tabelle 3.8: Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale von Dextran- β -Alaninestern

	Kohlenstoff	Signal [ppm]		Kohlenstoff	Signal [ppm]
AGE	C1	97,64	Substituent	C7	171,0/172,4
	C3	73,35		C8	31,1
	C2	71,26		C9	34,9
	C4	70,13			
	C5	69,41			
	C6	65,50			
	C6'	60,30			

Tabelle 3.9: Für elektrochemische Messungen an Dextran-Aminosäureestern verwendete Proben und ihr DS

Probenname	Aminosäure	DS
DGE	Glycin	1,29
DAE	β -Alanin	1,79
DOE	L-Ornithin	0,55
DLE	L-Lysin	1,20

DGE=Dextran-Glycinester,
DLE=Dextran-L-Lysinester

DAE=Dextran- β -Alaninester,

DOE=Dextran-L-Ornithinester,

den sich nicht voneinander, d.h. Konzentrationsschwankungen verfälschen das Ergebnis nicht. Gleiche Ergebnisse wurden für die anderen Dextran-Aminosäureester (DAE, DOE, DLE) gefunden.

Die massenunabhängigen Ladungsisothermen zeigen für die Aminoester DGE und DAE, die jeweils nur eine Aminogruppe an der substituierten Aminosäure tragen, je einen Protonierungsschritt, bei $5 > \text{pH} > 9,5$ für DGE und $7 > \text{pH} > 11$ für DAE. Bei DOE und DLE finden sich je zwei Protonierungsschritte, bei $5,5 > \text{pH} > 7$ und $7,5 > \text{pH} > 10$ (DOE) und bei $5 > \text{pH} > 8$ und $8,5 > \text{pH} > 11$ (DLE). Die erhaltenen Ladungsisothermen sind in Abbildung 3.10 und die genauen pK_a -Werte und der Vergleich zur Aminosäure und den Aminosäuremethylestern sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Durch die Veresterung verschieben sich die pK_a -Werte der α -Aminogruppen von Glycin, L-Ornithin und L-Lysin beträchtlich um den Wert von $\Delta\text{pK}_a \approx 2$ im Vergleich zur jeweiligen Säure.^[146–149] Durch den Verlust des Protons der Carboxyfunktion, das einen Teil seiner Elektronendichte auf den Carbonylkohlenstoff übertragen konnte, wodurch die Acidität bedingt wurde, ist beim Ester die elektronische Umgebung verändert: die dem Carbonylkohlenstoff naheliegende α -Aminogruppe, die in elektronischer Konjugation mit der C=O-Bindung des Carbonylkohlenstoffes steht, gibt wegen des -I-Effektes dieser Gruppe Elektronendichte ab, wodurch sie saurer wird, was sich im niedrigeren pK_a -Wert niederschlägt.^[150] Die Konjugation der Carbonylgruppe mit der Aminogruppe wurde, wie in Kapitel 3.2 gezeigt, in FTIR- und NMR-Experimenten belegt. Mit abnehmender Nähe der Aminogruppe zum Carbonylkohlenstoff wird der Unterschied des pK_a -Werts zwischen Säure und Ester geringer, beim β -Alanin beträgt er noch $\Delta\text{pK}_a = 1,3$, die ϵ -Aminogruppe des L-Lysins wird fast nicht mehr verändert. Durch die zusätzliche Distanz ist der -I-Effekt der Oxycarbonylgruppe entsprechend geschwächt.^[151] Bemerkenswert ist, daß beim L-Ornithinester für die δ -Aminogruppe $\Delta\text{pK}_a \approx 2,4$ gilt. Hier scheinen sterische Effekte eine Rolle zu spielen, bei denen die Länge des Alkylspacers Wechselwirkungen der Aminogruppen untereinander oder der δ -Aminogruppe mit dem per Doppelbindung an den Carbonylkohlenstoff gebundenen Sauerstoff begünstigen, die den neutralen Ester in einem 8-Ring stabilisieren.^[149] Für die zweiwertigen Aminosäuren, die bei $\text{pH}=3$ beide Aminogruppen protoniert vorliegen haben, wird zuerst die α -Aminogruppe deprotoniert, dann die δ - bzw. die ϵ -Aminogruppe. Vollständige Deprotonierung ist erreicht bei $\text{pH}=10$ bei DGE und DOE und $\text{pH}=11$ für DAE. Im Meßbereich von $3 > \text{pH} > 11$ ist DLE nicht komplett deprotoniert.

Die Unterschiede der pK_a -Werte der Aminogruppen zwischen Methyl- und Dextranestern sind gering und betragen maximal 0,35 pH-Einheiten (Abbildung 3.10). Sie können

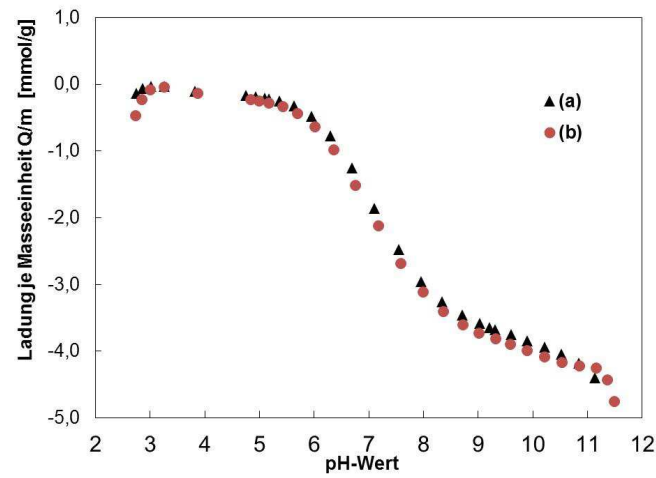


Abbildung 3.9: Ladungsisothermen eines Dextran-Glycinesters (DGE) mit Konzentrationen von a) $c=0,3$ mg/mL und b) $c=0,7$ mg/mL

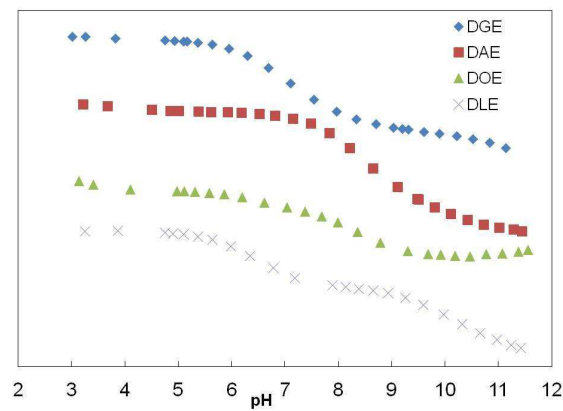


Abbildung 3.10: Ladungsisothermen eines Dextran-Glycinesters (DGE), eines Dextran- β -Alaninesters (DAE), eines Dextran-L-Ornithinesters (DOE) und eines Dextran-L-Lysinesters (DLE)

Tabelle 3.10: pK_a -Werte der Aminogruppen verschiedener Aminosäuren sowie ihrer Methyl- und Dextranester

Aminosäure	$pK_a(NH_3^+)$		
	Säure ^[146]	Methylester	Dextranester
Glycin	9,6	7,7 ^[147]	7,7
β -Alanin	10,19	9,25 ^[148]	8,9
L-Ornithin	8,69/10,76	6,50/8,32 ^[149]	6,4/8,4
L-Lysin	8,95/10,53	6,96/10,25 ^[149]	6,8/9,9

mit Meßungenauigkeiten erklärt werden. Das Polymerrückgrat beeinflusst demzufolge die Substituenten nicht in ihrem Protonierungsverhalten.

Es ist bekannt, daß Ester in alkalischem Medium in Gegenwart von Laugen, bspw. Natron- oder Kalilauge, hydrolysieren. Die Stabilität der Ester gegenüber alkalischer Hydrolyse wurde untersucht, indem die Proben startend bei $pH=3$ jeweils auf $pH=7$; 8; 9; 10; 11 (*hin*) und anschließend wieder auf $pH=3$ (*her*) in jeweils zwei Zyklen titriert wurden. Die erhaltenen Isothermen wurden verglichen, Gleichheit der Isothermen von verschiedenen Halbzyklen bedeutet Stabilität, unterschiedliche Formen weisen eine chemische Veränderung, z.B. Hydrolyse, nach. Für $3 > pH > 7$ zeigen DGE und DLE keine Veränderung der Isothermen. Sie sind also in diesem Bereich stabil. Im selben Bereich zeigen sich bereits Veränderungen für DOE. Lediglich DAE ist im Bereich $3 > pH > 8$ stabil. Darüber hinaus findet ein Abbau im alkalischen Milieu statt, der sich in der Dauer der Messung von rund 10 Minuten je Titrationszyklus bereits bemerkbar macht. Da die Esterhydrolyse jedoch nicht vollständig in dieser Zeit stattfindet, können die Isothermen des zweiten Zyklus weiter von denen des ersten Zyklus abweichen (Abbildung 3.11). In den Kurven a), c) und f) sind die Ladungsisothermen zu sehen, bei deren Titration der pH -Wert-Anstieg nicht ausreicht, die Ester zu hydrolysieren. Kurven b), d), e) und g) zeigen die Ladungsisothermen für den minimalen pH -Wert, bei dem sich die Ladungsisothermen von *hin* und *her* unterscheiden, Hydrolyse also stattfindet.

Polyelektrolyttitration wurde herangezogen zur Bestimmung des DPr in Abhängigkeit vom pH -Wert. Die durch die potentiometrische Titration erhaltenen Isothermen zeigen

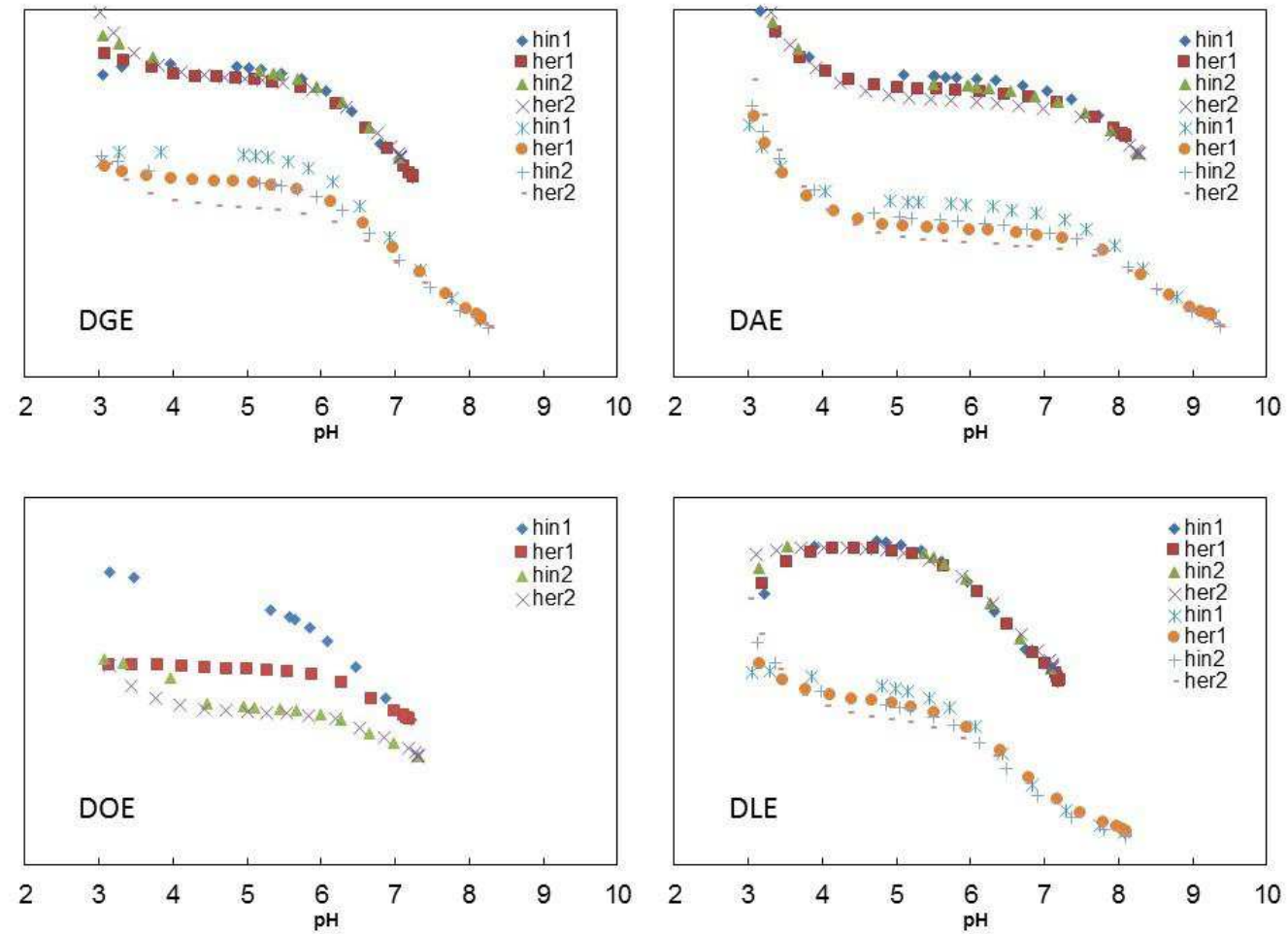


Abbildung 3.11: Stabilität von Dextran-Glycinester (DGE), Dextran- β -Alaninester (DAE), Dextran-L-Ornithinester (DOE) und Dextran-L-Lysinester (DLE) bei verschiedenen pH-Wert-Maxima

ab $\text{pH}=3$ keine Veränderung mehr, so daß der dort auftretende Wert als $\text{DPr}=100\%$ festgelegt wurde. Es wurden Proben bei saurem ($\text{pH}=3$), bei physiologischen ($\text{pH}=7,4$), und bei alkalischem pH -Wert ($\text{pH}=8,5$; 10) gelöst und gemessen. Die DPr -Werte finden sich in Tabelle 3.11. Mit ansteigendem pH -Wert nimmt der Gehalt an Ammoniumgruppen im Polymer ab. Aufgrund des geringen pK_a -Wertes von DOE ist dieses bereits bei $\text{pH}=8,5$ vollständig deprotoniert, wohingegen DGE und DAE bei gleichem pH noch zu $73,3\%$ bzw. $77,2\%$ protoniert vorliegen. Bei $\text{pH}=8,5$ ist DLE nur noch zu $41,4\%$ protoniert, jedoch puffert es aufgrund seiner sehr basischen ϵ -Aminogruppe noch bis $\text{pH}=10$, wo alle anderen Ester bereits deprotoniert wurden. Die so erhaltenen Prozentwerte sind in guter Übereinstimmung mit dem Verlauf der Ladungsisothermen der potentiometrischen Titration (Abbildung 3.10).

Die bei der potentiometrischen Titration zwar bemerkbare, jedoch zeitlich nicht quantifizierbare Hydrolysegeschwindigkeit kann mit Hilfe der Polyelektrolyttitration untersucht werden. Dazu wurden Proben bei verschiedenen pH -Werten gelöst ($\text{pH}=3,0$; $7,4$; 10) und zur Erfassung aller noch am Polymer verbliebenen Aminogruppen diese vor der Titration protoniert. Dies geschah durch Zugabe von $0,1\text{ M HCl}$ bis der pH -Wert 3 erreicht wurde, was nach potentiometrischer Titration 100% Protonierung entspricht. Dabei entspricht der Bereich zwischen $3 > \text{pH} > 7,4$ beispielhaft den pH -Werten im Körper, wohingegen $\text{pH}=10$ als Referenz für das Verhalten im alkalischen Milieu untersucht wurde.

Zur Charakterisierung des Verhaltens im alkalischen Medium, wo Hydrolyse am stärksten zu erwarten ist, wurden Vorversuche mit DAE bei $\text{pH}=8,5$ und bei $\text{pH}=12,5$ durchgeführt. Die pH -Werte wurden für die Dauer der Messungen konstant gehalten. Im schwach basischen Medium sollte die Hydrolyse nicht so schnell ablaufen wie im stark basischen. Es wurden jeweils nach $t=1\text{ h}$ und $t=24\text{ h}$ Teile der Lösung abgenommen, mit wässriger HCl auf $\text{pH}=3,5$ gebracht, um die Hydrolyse zu stoppen, und anschließend dialysiert und gefriergetrocknet. Auf diese Weise sollten alle niedermolekularen Verbindungen, wie freies β -Alanin, entfernt werden. Die so gereinigte Probe enthält nur noch den Dextran- β -Alaninester, der im FTIR-Spektrum ausschließlich das Signal der $\text{C}=\text{O}$ -Schwingung des Esters, nicht aber das der Säure zeigt. Außerdem finden sich aufgrund der durchgeführten Dialyse keine Signale für Carboxylate wie in vergleichbaren Untersuchungen.^[152] In Abbildung 3.12 sieht man das Verschwinden von ν_{CO} bei 1739 cm^{-1} im Verlauf der Zeit bei den beiden pH -Werten. Die in FTIR-Spektren stets sehr präsente Schwingung verliert deutlich an Dominanz, was ein Beleg für den Verlust an Funktionalität durch Hydrolyse ist. Was qualitativ in den FTIR-Spektren in Abbildung 3.12 zu sehen ist, kann durch anschließende Elementaranalyse auch quantitativ anhand des

Tabelle 3.11: DPr von Dextran-Glycinester (DGE), Dextran- β -Alaninester (DAE), Dextran-L-Ornithinester (DOE) und Dextran-L-Lysinester (DLE) in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH-Wert	DPr [%]			
	DGE	DAE	DOE	DLE
3	100	100	100	100
7,4	82,0	92,7	55,1	80,0
8,5	73,3	77,2	0	41,4
10	0	0	0	17,1

Tabelle 3.12: Abhängigkeit der Hydrolyse eines Dextran- β -Alaninesters von pH-Wert und Zeit

pH-Wert	t [h]	Stickstoff- gehalt [%]	DS
-	-	6,58	1,79
8,5	1	2,99	0,44
8,5	24	0,55	0,07
12,5	1	0,27	0,03

Stickstoffgehaltes der Proben gezeigt werden (Tabelle 3.12). Während nach einer Stunde bei pH=8,5 zwar ein deutlicher Verlust an Funktionalität zu sehen ist, der DS sinkt von 1,73 des Ausgangspolymers auf 0,44, ist aber immer noch ein Teil des β -Alanins am Dextran gebunden. Nach einem Tag Lagerung bei pH=8,5 ist der Ester fast vollständig hydrolysiert, was bei pH=12,5 schon nach einer Stunde eintritt. Dort ist ν_{CO} nicht mehr im FTIR-Spektrum zu erkennen.

Während das Verschwinden der Bande von ν_{CO} am deutlichsten die Hydrolyse beweist, kann man diese auch an anderen Signalen belegen. Im Gegensatz zum Ausgangspolymer, wo ν_{OH} ($\sim 3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$) und ν_{CH} ($\sim 3000\text{--}2750\text{ cm}^{-1}$) durch ν_{NH} ($\sim 3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) miteinander verbunden sind (Abbildung 3.12, a), sind diese Banden in den alkalisch behandelten Proben separiert. Dies liegt am Entfernen von Aminogruppen aus dem Polymer. Das Verschwinden der Bande für $\delta_{as}(\text{NH}_3^+)$ ($\sim 1500\text{ cm}^{-1}$) nach 24 Stunden bei pH=8,5 oder 1 Stunde bei pH=12,5 zeigt ebenfalls den Abbau der Funktionalität an.

Zur Quantifizierung der Stabilität gegenüber saurer und alkalischer Hydrolyse wurden die Ester bei pH=3,0; 7,4 und 10,0 über den Zeitraum einer Woche gelagert. Die Hydrolyse wird als Verlust an Amino-/Ammoniumgruppen am Polymer festgestellt, da der Polyelektrolyt Polyvinylsulfonsäure (PVS) nur mit am Polymer gebundenen Ammoniumgruppen wechselwirkt. Zur vollständigen Protonierung wurden die Proben bei pH=3,0 vermessen. Das Verhalten der Ester über den Zeitraum von einer Woche ist in Tabelle 3.13 zusammengefaßt. Bei pH=3,0 traten weniger als 10 % Verlust an Funktionalität durch saure Hydrolyse für die vier verschiedenen Ester DGE, DAE, DOE und DLE innerhalb der ersten Stunde auf. Im weiteren Verlauf sind die Ester bei pH=3,0 stabil und verlieren nicht noch mehr Substituent. Da die Esterhydrolyse im sauren Milieu reversibel ist, stellt sich auf diese Art ein Gleichgewicht ein, das weiteren Abbau verhindert. Für pH=7,4 ist nach einer Woche ebenfalls noch Aminosäure am Dextran gebunden, wobei aber ein stetiger Verlust für DGE, DOE und DLE festgestellt wurde. DAE hingegen zeigt bei pH=7,4 Stabilität und keine sinkende Ammoniumgruppenkonzentration. Durch das Einführen von potentiell geladenen Gruppen in α -Position ist die Hydrolysegeschwindigkeit leicht zu erhöhen.^[153] Je weiter entfernt vom Carbonylkohlenstoff die Aminogruppe ist, umso schwächer wird der Effekt.

Für die Methylornithinate ist bekannt, daß sie im alkalischen Medium nicht nur zu Hydrolyse neigen, sondern auch zur Lactambildung. Für die Methyl-4-amino-n-butyrate, dem um eine CH_2 -Gruppe kürzeren Homologen liegt das Verhältnis Hydrolyse:Aminolyse bei 1:19.^[149] Für die Methyl-Lysinate ist ein so starker Abbau nicht bekannt, doch scheinen hier zusätzlich räumliche Effekte durch Substitution an einem Polymer zum Tragen

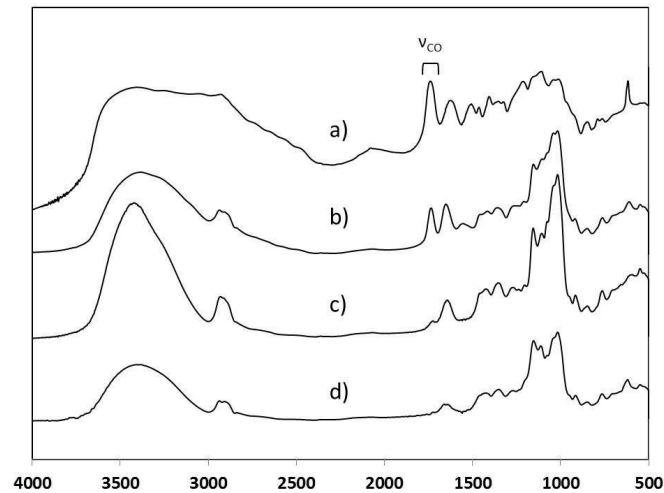


Abbildung 3.12: FTIR-Spektrum eines Dextran- β -Alaninester a) $t=0$, b) nach $t=1h$ bei $pH=8,5$, c) $t=24h$ bei $8,5$ und d) $t=1h$ bei $pH=12,5$

zu kommen. Die zu beachtenden Verhältnisse werden umso komplizierter, je größer und verzweigter die verwendete Aminosäure ist.^[153]

Bei Lagerung bei $pH=10$ sind alle Ester bereits nach einem Tag vollständig hydrolysiert, wobei auch hierbei der stabilste Ester DAE ist, bei dem nach drei Stunden noch substituierte Aminosäure nachgewiesen werden kann. Am schnellsten verläuft der Abbau für DOE, das bereits bei $t=0$ keine Aminosäure mehr am Polymer gebunden vorliegen hat. Auch hier ist der Effekt, den die α -Aminogruppe zur Beschleunigung der Hydrolyse hat, der entscheidende vor anderen möglichen Effekten. Die Besonderheit der Ornithinester^[149] zeigt sich aber auch hier.

Da alle Probenlösungen mit den gleichen vier Anfangsproben hergestellt wurden und trotzdem bei $t=0$ bereits unterschiedliche Werte aufweisen, ist davon auszugehen, daß der Großteil der Hydrolyse sehr schnell innerhalb der wenigen Minuten, die zwischen Probenvorbereitung und erster Messung liegen, vonstatten geht. Dies erklärt die Unterschiede der Startkonzentrationen, z.B. bei DAE von $c_{t=0}=5,16$ mmol/g ($pH=3,0$) und $c_{t=0}=4,3$ mmol/g ($pH=7,4$). Der Trend, daß bei höherem pH -Wert die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt, erklärt die fallenden Startwerte bei steigenden pH -Werten.^[149–151]

Tabelle 3.13: Konzentration der gebundenen Aminosäuren am Polymer in Abhängigkeit von pH-Wert und Zeit

pH	t	DGE	DAE	DOE	DLE
		c(AS)	c(AS)	c(AS)	c(AS)
	[h]	[mmol/g]	[mmol/g]	[mmol/g]	[mmol/g]
3,0	0	5,37	5,16	2,78	3,28
	1	5,12	5,12	2,75	3,28
	3	4,70	-	2,59	3,06
	4	-	4,94	-	-
	24	4,84	4,97	-	3,06
	48	-	4,97	2,53	3,09
	120	4,59	-	2,37	-
	144	4,56	-	2,31	2,75
	168	-	5,12	2,37	2,65
7,4	0	3,47	4,31	1,72	2,71
	1	4,03	4,31	1,62	2,62
	3	3,93	4,31	1,59	2,59
	24	3,72	4,31	1,53	2,47
	72	3,40	4,31	1,41	2,25
	168	3,21	4,96	1,37	2,09
10	0	1,06	3,28	0	1,84
	1	0	0,66	0	0,06
	3	0	0,19	0	0
	24	0	0	0	0

DGE=Dextran-Glycinester,
DLE=Dextran-L-Lysinester

DAE=Dextran- β -Alaninester,

DOE=Dextran-L-Ornithinester,

3.4 Untersuchungen zum Gentransfer

Wie in Kapitel 2.1 detailliert beschrieben, muß ein Vektor in der Lage sein, fünf Hürden zur erfolgreichen Transfektion zu überwinden (Abbildung 1.1). Diese sind zusammengefaßt:

- (A) Bildung eines stabilen Komplexes mit polyanionischen Nukleinsäuren und Maskierung ihrer Ladung,
- (B) keine unerwünschten Wechselwirkungen mit Bestandteilen des Blutes (Hämokompatibilität),
- (C) Wechselwirkung mit und Durchdringung der Zellmembran,
- (D) endosomale Freisetzung und
- (E) Erreichen des Zellkerns und transiente Genexpression.

Ergänzend zu diesen Grundanforderungen müssen Vektoren Schutz vor enzymatischem Abbau extra- und intrazellulär bieten und dürfen für die Zellen nicht toxisch sein.

Es hat sich eine Zahl von Experimenten durchgesetzt, auf deren Basis die Einschätzung der Güte von Vektoren erfolgt. Für die Experimente wurden Dextran-Aminosäureester mit unterschiedlichen DS-Werten ausgewählt. Die Proben mit ihren DS-Werten sind in Tabelle 3.14 aufgeführt.

3.4.1 Komplexbildung, Komplexstabilität und Schutz vor enzymatischem Abbau

Zur Testung der Komplexbildungseigenschaften der Polymere mit DNS wurde Heringssperma-DNS verwendet. Die DNS wurde in Lösung zur Bildung der Komplexe mit den ebenfalls gelösten Dextran-Aminosäureestern in unterschiedlichen N/P-Verhältnissen (Stickstoff der Aminogruppen zu Phosphor der Phosphate der DNS) bei pH=7,4 zugegeben. Anschließend wurde je zweimal gevortext und bei Raumtemperatur inkubiert.^[154]

Die Auswertung erfolgte über Fluoreszenzintensitätsmessung, wobei reine Heringssperma-DNS als Referenz genutzt wurde. Die unkomplexierten Polymere selbst weisen keine Fluoreszenz auf. In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse aufgeführt. Der Anteil unkondensierter DNS wurde über die Fluoreszenzintensität des DNS-Interkalationsfarbstoffes Ethidiumbromid nach Inkubation mit den Komplexen im Verhältnis zu DNS ohne Polymer berechnet und ist in [%] angegeben. Es zeigt sich, daß die Glycinester unabhängig vom DS und vom N/P-Verhältnis kaum in der Lage sind, DNS zu binden oder gar zu kondensieren, so daß für alle getesteten Polymere in verschiedenen N/P-Verhältnissen mehr als 70 % der DNS ungebunden vorliegen. Im Vergleich dazu ist die Bindekapazität

Tabelle 3.14: DS-Werte der für die *in vitro*-Charakterisierung verwendeten Dextran-Aminosäureester

Dextran- Glycinester		β -Alaninester		L-Lysinester	
Probe	DS	Probe	DS	Probe	DS
11a	0,29	12a	0,07	13a	0,33
11b	0,39	12b	0,21	13b	0,61
11c	0,53	12c	0,69	13c	0,68
11d	0,62	12d	1,16	13d	0,77
11e	0,83	12e	1,50		
11f	0,88	12f	1,68		
11g	1,09				

der β -Alaninester stark abhängig vom DS und oberhalb eines DS-Wertes von 0,69 unabhängig vom N/P-Verhältnis. Liegt der DS-Wert höher als 0,69 sind auch bei niedrigen N/P-Verhältnissen von 0,5 mehr als 95 % der DNS gebunden. Probe **12c** (DS=0,69) bindet ab N/P-Verhältnissen von ≥ 2 ebenfalls mehr als 95 % der DNS, bei Proben **12a** und **12b** liegen unabhängig vom N/P-Verhältnis mindestens 30 % ungebundene DNS vor. Hier liegt ein Zusammenhang mit der aus dem DS resultierenden höheren Ladungsdichte bei höher substituierten Dextranen vor. Dies zeigt sich auch bei den L-Lysinestern, die bereits bei niedrigen N/P-Verhältnissen von 0,5 bei einem DS von 0,77 zu über 90 % binden. Bei höheren N/P-Verhältnissen sind auch geringer substituierte Ester in der Lage, mehr als 95 % der DNS zu binden und Komplexe zu bilden.

Die Ursachen für das Verhalten der Dextran-Aminosäureester sind die Lage der Aminogruppe in der Aminosäure und der DS. Je höher der DS ist, umso höher ist auch die Ladung durch Protonierung bei den entsprechenden pH-Werten. Durch die in Kapitel 3.2 festgestellte elektronische Abhängigkeit der α -Aminogruppen von der Carboxylfunktion sind deren pK_a -Werte (Tabelle 3.10) niedriger als der pH-Wert bei den Untersuchungen. D.h., daß lediglich ein geringer Anteil von Aminogruppen protoniert vorliegt, also die Ladungsdichte deutlich geringer ist, als bei einem β -Alaninester mit vergleichbarem DS. Bei den L-Lysinestern wird die mangelnde Protonierung der α -Aminogruppe durch die

ϵ -Aminogruppe ausgeglichen, die auch bereits bei höheren pH-Werten protoniert ist. Singh *et al.*^[104] beschreiben für ein kationisches Lipid ein vergleichbares Ergebnis (Struktur in Abbildung 3.13). Dort werden die Kopfgruppen von kationischen Lipiden mit Glycin bzw. β -Alanin modifiziert und die Glycinderivate sind nicht in der Lage, DNS zu binden, was mit größeren hydrodynamischen Radien der Lipoplexe infolge geringer Kondensation begründet wird. Als Grund wird die veränderte Struktur durch die zusätzliche Methylengruppe genannt. Dafür spricht, daß neben den höheren pK_a -Werten der Nicht- α -Aminogruppen diese größere Abstände zum Polymerrückgrat haben können und sterische Hinderung bzw. Abschirmung somit schwerer möglich ist. Die höhere Komplexbildungseffizienz der L-Lysinester bei niedrigeren DS-Werten ist ein Beleg dafür, da die ϵ -Aminogruppen weiter entfernt und dadurch sterisch weniger gehemmt durch das Polymerrückgrat sind. Die α -Aminogruppe leistet entsprechend lediglich einen vernachlässigbaren Beitrag zur Polyplexbildung, so daß in Folge auf die Glycinderivate nicht mehr eingegangen wird, da sie ohne gute Komplexbildungseigenschaften für den Gentransfer nicht zu verwenden sind.

Außer- wie auch innerhalb der Zelle ist der Komplex Nukleasen, die die DNS abbauen können, ausgesetzt.^[155] Der Vektor muß daher nicht nur in der Lage sein, mit der DNS einen stabilen Komplex zu bilden, sondern die DNS auch so abzuschirmen, daß sie von diesen Enzymen nicht abgebaut werden kann.

Das Vermögen der Vektoren, die DNS vor Abbau zu schützen, wurde mittels Gelelektrophorese untersucht. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte DNS und Komplexe ohne Zugabe der Nuklease (DNase I) verwendet. Als Positivkontrollen wurden DNS und DNase I ohne Vektor verwendet. Die Polyplexe wurden bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 getestet. Ein geeigneter Vektor tritt mit der DNS derart in Wechselwirkung, daß sie räumlich kompakter vorliegt als als freie DNS. Dies gilt als

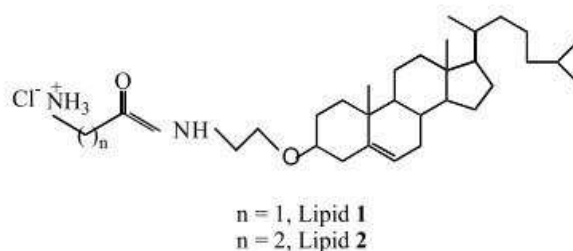


Abbildung 3.13: Struktur Cholesterol-basierter kationischer Lipide mit Glycin (**1**) und β -Alanin (**2**) als Kopfgruppe

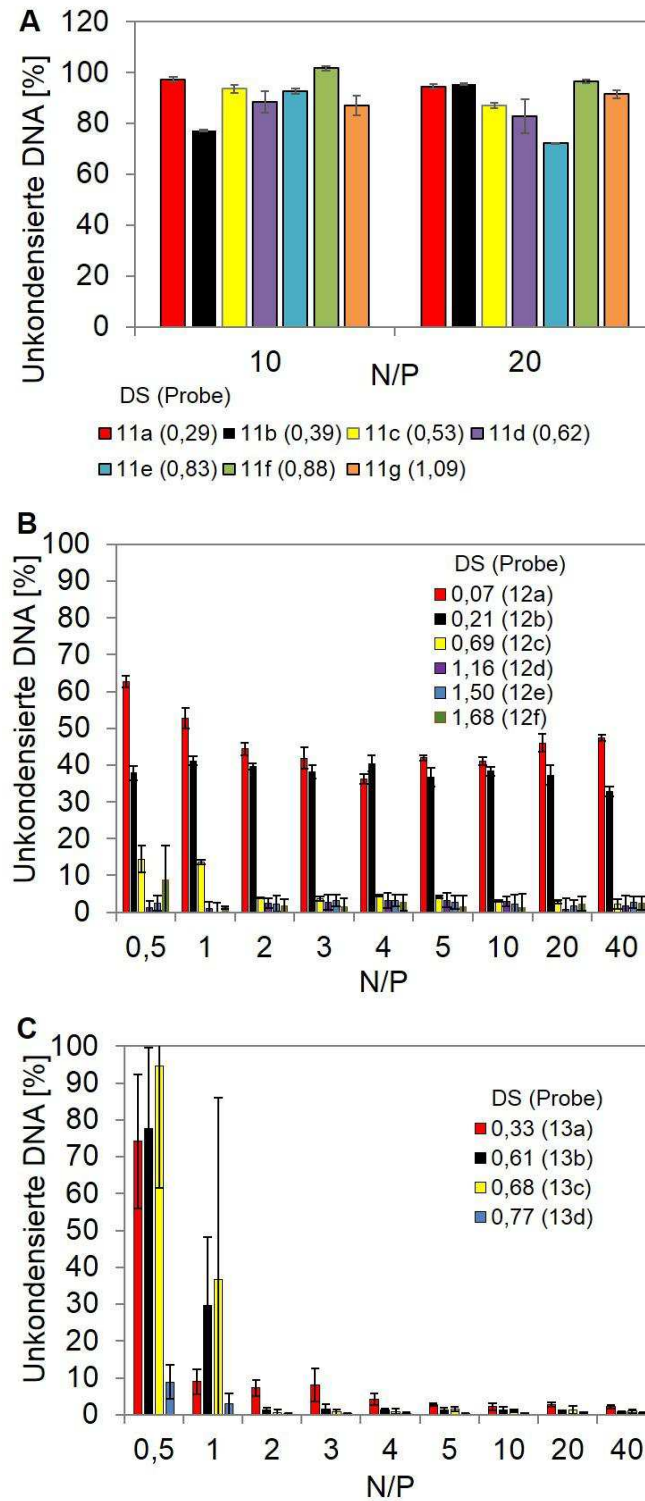


Abbildung 3.14: DNS-Bindungseffizienz von Dextran- (A) Glycinestern, (B) β -Alaninestern und (C) L-Lysinestern nach Bestimmung mittels Fluoreszenz im AccuBlue-Assay

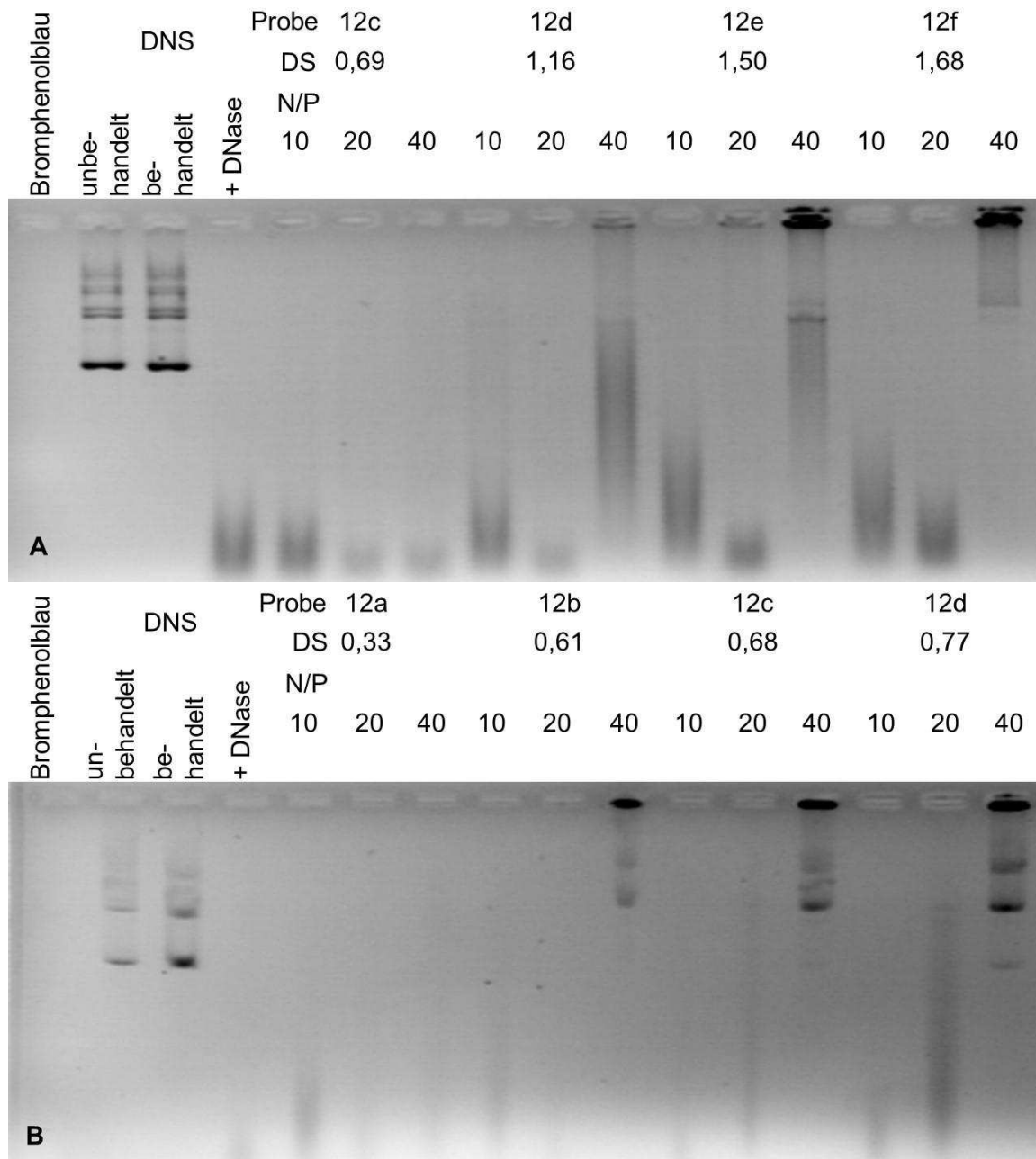


Abbildung 3.15: Fotografie der Agarosegele nach Experimenten zum Schutz vor Abbau von Plasmid-DNS durch DNase I mit (A) Dextran- β -Alaninester und (B) Dextran-L-Lysinestern bei verschiedenen N/P-Verhältnissen und DS-Werten

Vorbedingung für die Eignung als Vektor.^[2,156] Dadurch werden DNasen sterisch gehindert, diese abzubauen. Außerdem ist die Maskierung der negativen Ladung der DNS Voraussetzung für den Schutz vor Abbau durch DNase I.

In Abbildung 3.15 sind die Ergebnisse zur Komplexbildungskapazität der Polymere mit DNS zusammengefaßt. Scharfe Banden bedeuten dabei, daß der Komplex intakt und nicht dissoziiert vorliegt und die DNS abgebaut wurde, unscharfe Banden zeigen den Abbau an. Bei der Negativkontrolle (unbehandelte DNS) sind hauptsächlich die typischen Banden der *supercoiled* und der linearen Plasmid-DNS zu sehen. Die L-Lysinester bilden sehr stabile Komplexe mit der DNS. Sie bieten bereits ab $DS=0,68$ Schutz vor Abbau durch Enzyme beim N/P-Verhältnis von 40, was sich in scharfen Banden im Gel niederschlägt. Die Plasmid-DNS konnte nicht vollständig aus den Komplexen und anschließend aus den Auftragungstaschen mit Dextransulfat herausgelöst werden. Die Maskierung der Ladung der Plasmid-DNS wird von allen Polymeren erst ab einem N/P-Verhältnis von 40 erreicht. Die β -Alaninester gewährleiten erst ab $DS=1,50$ nennenswerten Schutz, was eine scharfe Fluoreszenzbande in der Auftragungstasche zur Folge hat. Es gelang hierbei nicht, die DNS mit Dextransulfat aus dem Komplex zu lösen, so daß keine Aussage über den Abbaugrad der DNS möglich ist. Man kann jedoch von intakten Strukturen ausgehen.

Die Eigenschaften der Dextran-Aminosäureester sind sehr stark von der Aminosäure abhängig bzw. den pK_a -Werten der jeweiligen Aminogruppen der Ester. Glycinester binden aufgrund ihrer α -Aminogruppen ($pK_a=7,7$; siehe Kapitel 3.3), die bei $pH=7,4$ in geringerem Umfang protoniert vorliegen, nicht mit der verwendeten Plasmid-DNS. β -Alanin- ($pK_a=8,9$) und L-Lysinester ($pK_{a,\epsilon}=9,9$) hingegen sind aufgrund höherer pK_a -Werte in der Lage, die DNS zu binden, wobei sich auch hier die Unterschiede widerspiegeln und die L-Lysinester besseren Schutz vor DNasen bei geringeren DS-Werten bieten. Die L-Lysinester sind in ihren Eigenschaften den Poly-L-Lysinen daher ähnlich.^[60]

3.4.2 Hydrodynamischer Durchmesser und Ladung der Polyplexe

Für die erfolgreiche Penetration der Zellmembran ist es notwendig, daß die Komplexe ausreichend kationisch geladen sind und eine Größe von 60-200 nm haben, um elektrostatische Wechselwirkungen mit der Zellmembran zu realisieren und endozytotische Wege ins Zellinnere zu aktivieren. Die Komplexe wurden im Zetasizer bei N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 zur Bestimmung von Zetapotential und der Partikelgröße untersucht. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und einem Streuwinkel von 173° für 240 s. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 3.16.

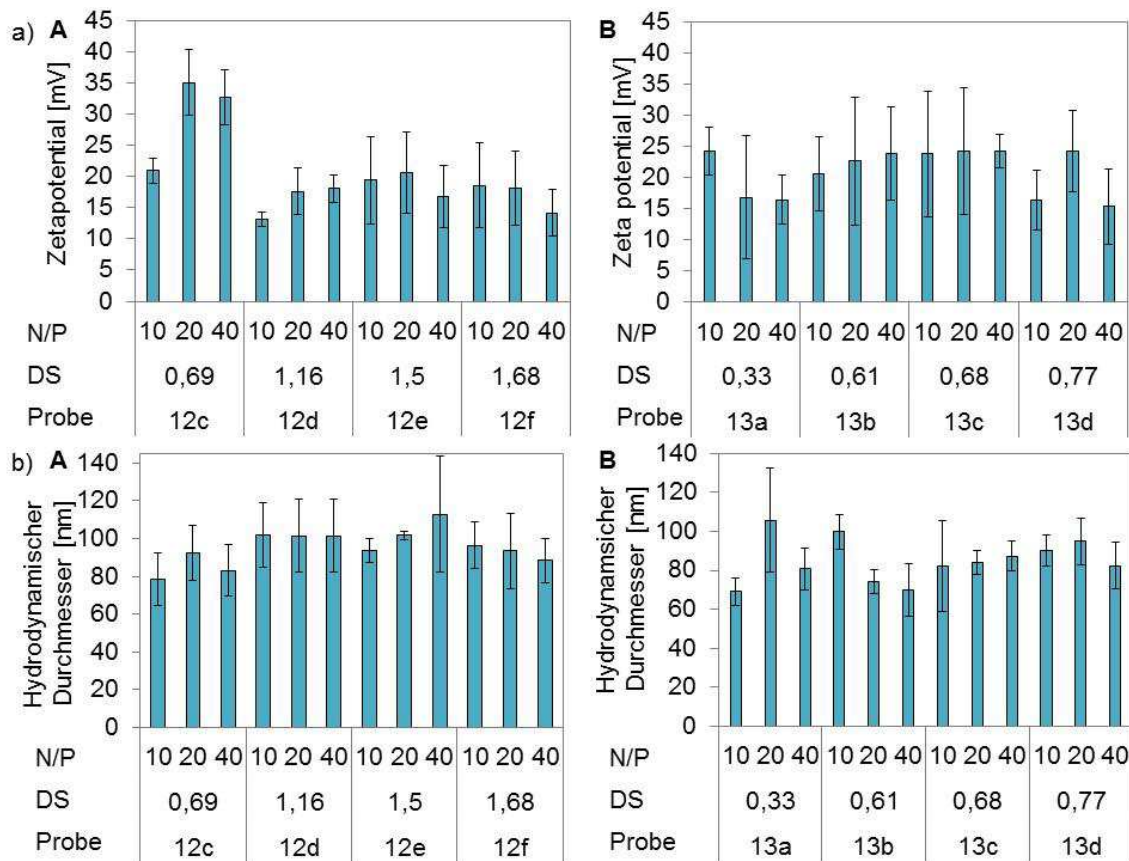


Abbildung 3.16: a) Zetapotentiale und b) hydrodynamische Durchmesser der Polyplexe aus DNS und (A) Dextran- β -Alaninester und (B) Dextran-L-Lysinester

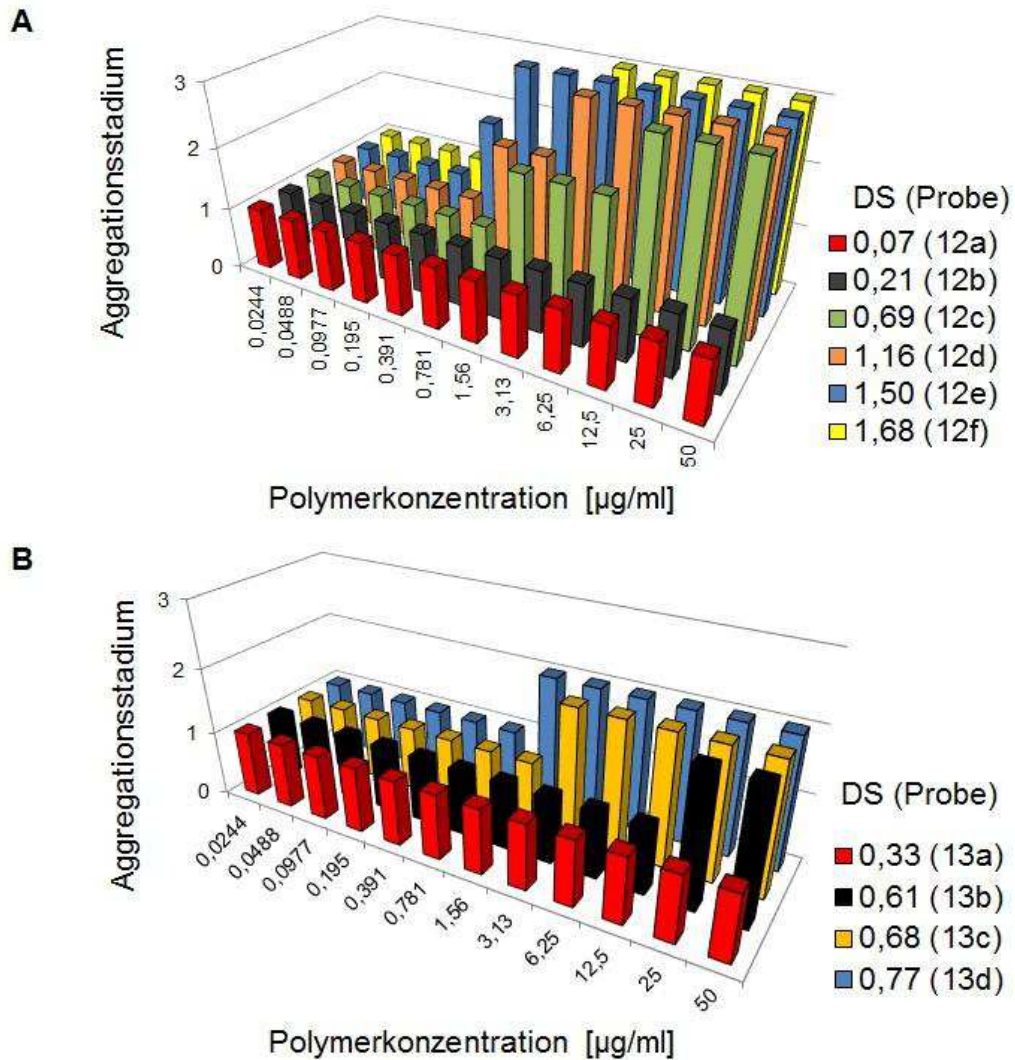
Die Komplexe beider Arten von Aminosäureestern und Plasmid-DNS weisen unabhängig vom DS ähnliche Zetapotentiale auf (Abbildung 3.16). Für β -Alaninester liegen sie zwischen $13 \pm 1,1$ mV und $35,1 \pm 5,3$ mV, für die L-Lysinester zwischen $15,4 \pm 6,1$ mV und $24,3 \pm 3,9$ mV. Der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe ist ebenfalls vom DS-Wert unabhängig. Für β -Alaninester liegen sie zwischen 78 nm und 113 nm und für L-Lysinester zwischen 69 nm und 106 nm. Es liegen also für beide Aminosäureester Polyplexe mit kationischer Ladung vor, die für die elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Zellmembran nötig sind. Größen um 100 nm erscheinen für die endozytotische Aufnahme in die Zelle durch die Membran als geeignet.^[157,158]

3.4.3 Hämokompatibilität und Zytotoxizität

Die Polyplexe können aufgrund der positiven Ladung nicht nur mit der Oberfläche der Zellmembran wechselwirken, sondern als Ausdruck des *charge dilemmas* (Kapitel 2.2.2) auch unerwünschte Effekte zur Folge haben. In der Blutbahn kann dies zur Aggregation der roten Blutkörperchen, also Thrombenbildung, führen. Das hämotoxische Aggregationsverhalten der Polymere wurde bei Konzentrationen zwischen 0,244-50 $\mu\text{g/mL}$ untersucht. Die Thrombenbildung wurde mittels Abnahme der Absorption der Lösung bei 645 nm im Vergleich zur Negativkontrolle untersucht. Eine mikroskopische Untersuchung sowie eine Einordnung in nicht aggregierend, gering aggregierend und stark aggregierend wurden ebenfalls durchgeführt.

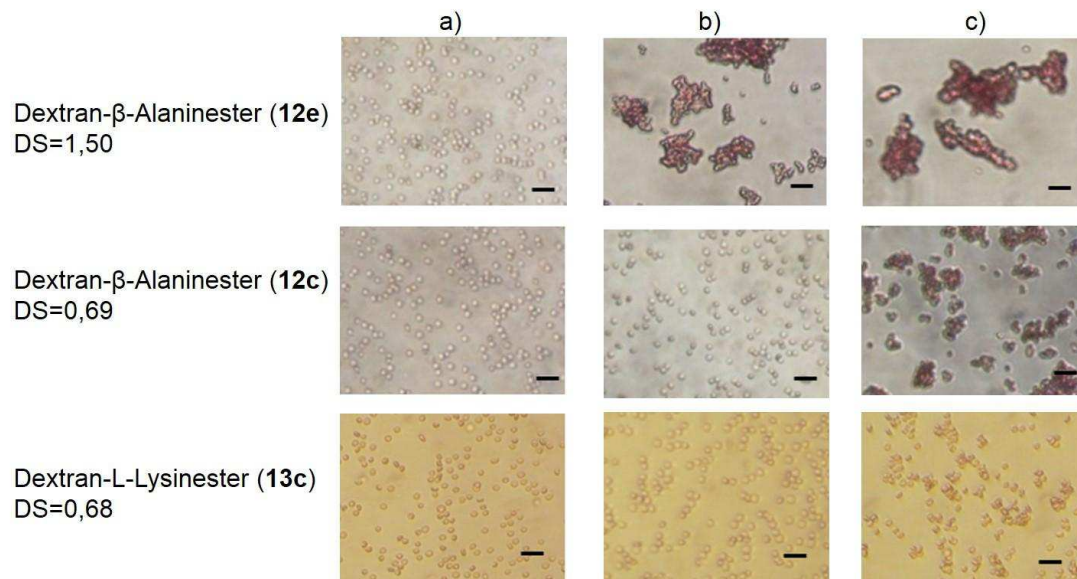
Für beide Arten Dextranaminosäureester korrelierte das Ergebnis mit zunehmendem DS-Wert und Konzentration des Polymers (Abbildung 3.17). War beides niedrig, erfolgte keine Aggregation der Blutkörperchen. Bis DS=0,21 zeigte sich nach Behandlung mit β -Alaninestern keine Aggregation, höher substituierte Polymere verursachten Aggregationen bei unterschiedlichen Konzentrationen, DS=0,69 (**12c**) bei 1,15 $\mu\text{g/mL}$, DS=1,16 (**12d**) und DS=1,68 (**12f**) ab 1,56 $\mu\text{g/mL}$ und DS=1,50 (**12e**) bereits ab 0,391 $\mu\text{g/mL}$. Wenn mit der Positivkontrolle (25000 g/mol LPEI, 30 $\mu\text{g/mL}$) vergleichbare Absorptionswerte auftraten, wurde von starker Aggregation ausgegangen. **12c** (DS=0,69) erreicht dieses Level der Aggregation bei 12,5 $\mu\text{g/mL}$, **12d** (DS=1,16), **12f** (DS=1,68) bei 3,13 $\mu\text{g/mL}$ und **12e** (DS=1,50) bei 0,781 $\mu\text{g/mL}$.

Für Behandlung mit L-Lysinestern wurde Aggregation für DS=0,61 (**13b**) bei 25 $\mu\text{g/mL}$, für DS=0,68 (**13c**) bei 3,13 $\mu\text{g/mL}$ und für DS=0,77 (**13d**) bei 1,56 $\mu\text{g/mL}$ gefunden. Die Aggregationen wurden als gering eingestuft. Somit zeigen die L-Lysinester eine geringere hämotoxische Aggregation als β -Alaninester mit vergleichbarem DS, was an Polymeren **12c** und **13c** direkt verglichen werden kann. Die DS-Werte betragen 0,69 bzw. 0,68 und



1=keine Aggregation, 2=leichte Aggregation, 3=starke Aggregation

Abbildung 3.17: Makroskopische Beurteilung der Stufen der Aggregation roter Blutkörperchen nach Behandlung mit Dextran- (A) β -Alaninestern und (B) L-Lysinestern verschiedener DS und Konzentration



Balkenlänge = 20 μm

Abbildung 3.18: Aufnahmen des Aggregationsverhaltens roter Blutzellen nach Behandlung mit a) 0,02 $\mu\text{g/mL}$ b) 0,78 $\mu\text{g/mL}$ und c) 50 $\mu\text{g/mL}$ Dextranaminosäureester

leichte bzw. starke Aggregation werden von **12c** bei 1,56 $\mu\text{g/mL}$ bzw. ab 12,5 $\mu\text{g/mL}$ erreicht, wohingegen leichte Aggregation von **13c** erst ab 3,13 $\mu\text{g/mL}$ und starke gar nicht erreicht werden. Die Aggregation wurde auch per Mikroskop untersucht. Die Unterschiede der Aggregation, die die Proben **12c** (DS=0,69) und **13c** (DS=0,68) verursachen, sind gut in Abbildung 3.18 zu erkennen. Zum Vergleich ist dort die stark aggregierende Probe **12e** (DS=1,50) ebenfalls dargestellt.

Neben der Aggregation besteht die Möglichkeit der Schädigung der Erythrozytenmembran durch den Vektor. Zur Untersuchung der Hämolyse wurden Erythrozyten mit den Polymeren 1 h lang behandelt. Die Absorption des durch die Lyse freigesetzten Hämoglobins wurde bei 544 nm gemessen und im Verhältnis zur Positivkontrolle (Triton-X 100) wurde die Hämolyse in % berechnet. Ein Phosphatpuffer (PBS) diente als Negativkontrolle. Nach ASTM F756-08^[159] gelten Substanzen mit weniger als 2 % als nicht hämolytisch und im Bereich von 2-5 % als leicht hämolytisch. In Abbildung 3.19 sind die Ergebnisse dargestellt.

Selbst bei einer Maximalkonzentration von 500 $\mu\text{g/mL}$ sind die L-Lysinester mit Werten unter 2 % nicht hämolytisch, für die β -Alaninester mit vergleichbaren DS-Werten gilt dasselbe. Steigt bei diesen der DS-Wert weiter, sind die Verbindungen ab einem $\text{DS} \geq 1,5$

(**12e/f**) als leicht hämolytisch einzustufen. Der Grund ist, wie bei der Aggregation der Erythrozyten, die höhere Anzahl Ladungen durch den höheren DS am Polymer, die stärkere elektrostatische Wechselwirkungen mit den Erythrozyten ermöglicht.

Eine weitere potentielle toxische Eigenschaft infolge von positiver Ladung ist die Zytotoxizität. Die Zellmembranen können nach elektrostatischer Wechselwirkung mit der kationischen Ladung in ihrer Integrität so gestört werden, daß diese „löchrig“ und so zerstört werden. Hohe Ladungsdichten, wie beispielsweise beim PEI, tragen zur Zytotoxizität bei.^[29–31]

Die Zytotoxizität drückt sich in der Zellviabilität aus. Je größer der prozentuale Anteil an lebenden Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit dem Polymer ist, umso höher ist diese und umso niedriger die Zelltoxizität. Ist die Zellviabilität $>70\%$ ^[160], wird eine Verbindung als nicht-toxisch eingestuft. In den Experimenten zur Zytotoxizität wurden murine Fibroblasten als Beispielzellen verwendet.

Für $DS \geq 0,69$ (β -Alaninester) sank nach der Behandlung die Viabilität mit steigender Konzentration, bis sie bei $62,5\ \mu\text{g/mL}$ die 70% -Grenze unterschritt. Für Proben mit DS-Werten, die niedriger sind (**12a/b**), wurde keine Toxizität gefunden. Bei der Behandlung mit L-Lysinestern trat generell eine höhere Zellviabilität auf, die Toxizitätsgrenze wurde erst bei $125\ \mu\text{g/mL}$ unterschritten und im direkten Vergleich eines β -Alaninesters mit $DS=0,69$ (**12c**) und eines L-Lysinesters mit $DS=0,68$ (**13c**) ist die Viabilität bei letzterem 6-fach höher (Abbildung 3.20). Somit zeigt sich eine Abhängigkeit der Toxizität von der Art der Aminosäure, dem DS des Polymers und der Konzentration. Bei den Tests zur Erythrozytenaggregation und der Zytotoxizität bedeuten dabei steigende DS-Werte und steigende Konzentrationen einen Anstieg der negativen Eigenschaften.

Daß die L-Lysinester in diesen Untersuchungen weniger toxisch sind, ist interessant, da bei gleichem DS und pH-Wert die L-Lysinester mehr Ladungen tragen als die β -Alaninester, deren pK_a -Wert geringer ist, und sie somit eine höhere Ladungsdichte pro AGE tragen müßten. Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, daß, wie schon bei den Komplexbildungseigenschaften festgestellt, für die Eigenschaften der Aminosäureester die Lage der Aminogruppen im Molekül eine Rolle spielt und nicht nur ihre elektronischen Eigenschaften.

3.4.4 Transfektion

Die Überwindung der Hürden (**C**), (**D**) und (**E**) (siehe Kapitel 2.1) ist nach Singh *et al.*^[161] in Teilschritten untersuchbar. Im Rahmen der an den Dextran-Aminosäureestern durchgeführten Untersuchungen wird der Erfolg bei der Überwindung dieser Hürden im

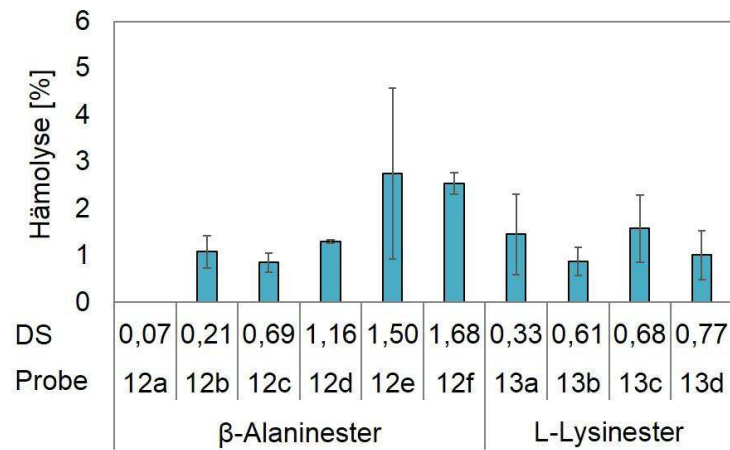


Abbildung 3.19: Hämolyseigenschaften verschiedener Dextran- β -Alaninester und L-Lysinester bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/mL}$

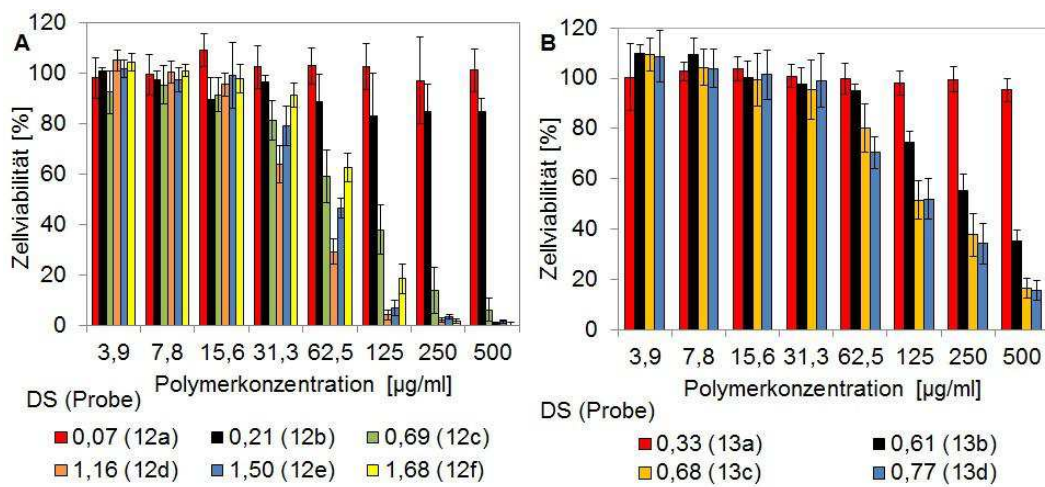


Abbildung 3.20: Zellviabilitäten muriner Fibroblasten nach 24-stündiger Behandlung mit Dextran- (A) β -Alaninester und (B) L-Lysinestern verschiedener Konzentrationen und DS

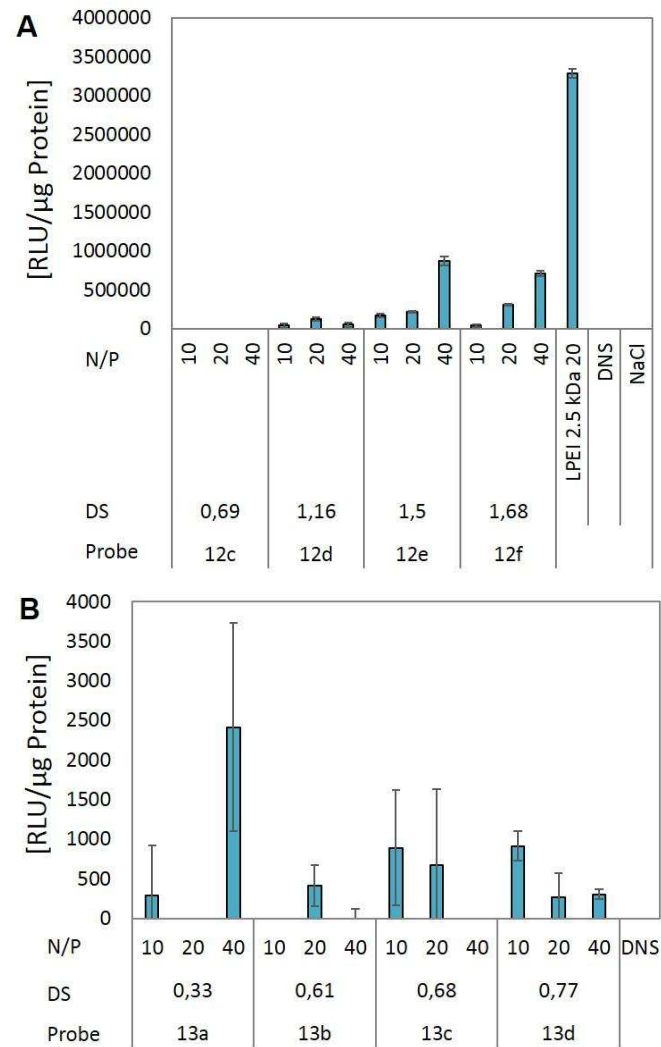


Abbildung 3.21: Transfektionseffizienzen von Dextran- (**A**) β -Alaninestern und (**B**) L-Lysinestern bei verschiedenen N/P-Verhältnissen

Experiment zur Transfektionseffizienz zusammengefaßt. Dabei wurde CHO-K1-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit den Komplexen bei Raumtemperatur mit dem Luciferase-Reporter (pGL3) transfiziert. Nach 44 Stunden Wachstumsphase zur Transkription und Translation der Luciferase wurden die von der Zelle gebildeten Proteine aus der Zelle extrahiert und mit einem Assay, bei dem Luciferin und Cofaktoren zugegeben werden, über die Lumineszenz die gebildete Luciferasemenge quantitativ bestimmt. Als Negativkontrolle diente Plasmid-DNS ohne Vektor, als Positivkontrolle ein Komplex aus Plasmid-DNS und 2500 g/mol LPEI als Vektor. Als Zellen wurden CHO-K1-Zellen genutzt. Zur Stabilisierung der Komplexe in dem im Vergleich zu vorherigen Experimenten komplexen System Zelle wurden diese in höheren N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 eingesetzt.^[162] Die Meßwerte von Negativ- und Positivkontrolle ergaben einen Meßbereich von $417 \pm 111,8$ RLU/ μ g Protein (0 %) bis $13,5 \cdot 10^6 \pm 64,8 \cdot 10^3$ RLU/ μ g Protein (100 %).

Die Transfektionseffizienz ist von drei Faktoren abhängig: der Art Aminosäure, dem DS und dem N/P-Verhältnis. Die höchsten Effizienzen wiesen β -Alaninester mit $DS > 1$ auf, mit einem Maximalwert von 870294 ± 57530 RLU/ μ g Protein bei $DS = 1,50$ (Abbildung 3.21). Die beiden Höchstwerte bei $DS = 1,50$ (**12e**) und $DS = 1,68$ (**12f**) entsprechen dabei 26,5 % bzw. 21,7 % der Positivkontrolle PEI. Diese Ergebnisse wurden erreicht für N/P-Verhältnisse von 40, bei geringeren Verhältnissen zeigte sich eine deutlich geringere Transfektion, mit der Ausnahme der Probe mit $DS = 1,16$ (**12d**), die beim N/P-Verhältnis von 20 die höchste Transfektion aufweist.

Die L-Lysinester geben ein anderes Bild ab. Sie zeigten durchgängig sehr niedrige Transfektionseffizienzen von $< 0,02$ % der Positivkontrolle. Damit verhalten sich die L-Lysinester wie Poly-L-Lysine, die ebenfalls stabile Polyplexe bilden, jedoch nicht in der Lage sind, das Endosom derart zu penetrieren, daß die DNS ins Zellplasma übergehen kann.^[163] Sonawane *et al.*^[39] geben dafür als Grund an, daß die ϵ -Aminogruppen bei physiologischen pH-Werten bereits in einem Umfang protoniert vorliegen, daß sie einerseits gute Komplexe bilden, aber keine zusätzlichen Ammoniumgruppen beim Absenken des pH-Wertes hinzukommen, um das Endosom erfolgreich im Sinne des *proton sponge*-Effektes zu penetrieren. Die α -Aminogruppen, die bei PLL nicht vorliegen, sind noch nicht ausreichend protoniert oder auch sterisch gehindert, um zum Verlassen des Komplexes bzw. der Plasmid-DNS einen Beitrag zu leisten. Als Beleg dafür, daß die Polyplexe zwar in die Zelle eindringen, jedoch das Endosom nicht mehr verlassen, sind die Ergebnisse eines Experimentes zu werten, bei dem nach zusätzlicher Zugabe von Chloroquin, einem basischen Reagenz, das bekannt dafür ist, Endosomen zu zerstören, die Transfektion

anstieg.^[161] Dabei wurde gefunden, daß auf diese Art die Transfektionseffizienz auf bis das 250-fache ($DS=0,77$; $N/P=10$) ansteigen kann und als Höchstwert 3,1 % der Transfektionseffizienz der Positivkontrolle LPEI erreichte.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Eigenschaften der Dextran-Aminosäureester als Vektoren von der Aminosäure, dem DS-Wert und dem N/P-Verhältnis abhängen. Die Glycinester sind aufgrund geringer Ladungsdichte durch zu niedrige pK_a -Werte nicht in der Lage, Plasmid-DNS zu komplexieren, was β -Alanin- und L-Lysinester können, da hier andere als nur α -Aminogruppen vorliegen. Es liegt eine Abhängigkeit vom DS vor: β -Alaninester mit DS-Werten kleiner als 0,69 konnten DNS überhaupt nicht komplexieren. Polymere mit höheren DS-Werten konnten ab $N/P=0,5$ stabile Komplexe bilden. Die L-Lysinester mit DS-Werten ab 0,33 waren bei N/P-Verhältnissen von ≤ 2 dazu ebenfalls in der Lage. Die Toxizität der sehr gut transfizierenden β -Alaninester ist höher als für die L-Lysinderivate, die sich unter den getesteten Bedingungen als nicht-toxisch erwiesen. Von der Art der Aminosäure hängt der Schutz vor DNasen ab: L-Lysinderivate sind schon bei niedrigeren DS-Werten ($\geq 0,61$, $N/P=40$) in der Lage, Schutz zu bieten, wohingegen β -Alaninester erst ab einem DS-Wert von 1,5 Schutz vor enzymatischem Abbau gewähren. Dieser Schutz vor DNasen korreliert mit den Transfektionswerten der β -Alaninester. Hochsubstituierte Derivate ($DS \geq 1,5$), die bereits Schutz bieten, transfizieren sehr gut. Gleichzeitig ist ihre Toxizität am höchsten, was das *charge dilemma* verdeutlicht. Die L-Lysinderivate verhalten sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Poly-L-Lysinen auch wie diese: sie bilden stabile Komplexe, die Schutz vor Abbau durch DNase I bieten, die Polyplexe können aber nicht das Endosom verlassen.

Reine Dextran- α -Aminosäureester erscheinen als ungeeignet für eine Anwendung beim Gentransfer. Die besten Eigenschaften zeigten sich aufgrund des geeigneten pK_a -Wertes bei β -Alaninestern. Als ideales System zur Transfizierung von CHO-K1-Zellen mit pGL3 boten sich daher β -Alaninester mit $DS=1,5$ an, die die höchste Transfektion erzielten, sowie Schutz vor enzymatischem Abbau durch DNase I bieten. Ihre toxischen Eigenschaften sind zwar bei hohen Konzentrationen hoch, jedoch ist die Konzentration, ab der man von Zytotoxizität spricht, für sie sehr hoch ($62,5 \mu\text{g/mL}$), ebenso für die Erythrozytenaggregation ($50 \mu\text{g/mL}$). Die Proben sind nur in geringem Maße hämolytisch. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen zum Gentransfer der Verbindungen **11-13** sind bei Zink^[164] ausführlich zu finden.

3.5 Dextran-Aminosäuremischester

3.5.1 Synthese und Charakterisierung

Nach den in Kapitel 3.4 diskutierten Ergebnissen, die die gute Transfektion der Dextran- β -Alaninester bei geringem Schutz vor DNasen, die Komplexstabilität und den Schutz vor DNasen der Dextran-L-Lysinester bei schlechter Transfektion belegen, war es von Interesse, Dextran- β -Alanin-L-Lysin-Mischester zu synthetisieren, zu charakterisieren und ihr Verhalten beim Gentransfer zu untersuchen.

Die Proben **14a-e** wurden unter Aktivierung der Carboxyfunktion mit CDI in DMSO nach der in den Kapiteln 3.1.1 und 3.2 etablierten Methode synthetisiert. Dazu wurde als maximales Molverhältnis AGE:AS 1:4 eingestellt und die einzelnen Verhältnisse der Boc-geschützten Aminosäuren zueinander variiert (Tabelle 3.15). Es wurde zum Entschützen 10 %-ige Schwefelsäure in 1,4-Dioxan verwendet.

Die Bestimmung des DS-Wertes aus den Werten der Elementaranalyse mußte für die Mischester angepaßt werden. Da es sich mit β -Alanin, L-Lysin und dem Gegenion der Ammoniumgruppen, SO_4^{2-} (siehe Kapitel 3.2) um drei Substituenten handelt, ist die Bestimmung nur aus den zwei Werten für Stickstoff- und Schwefelgehalt, die die Elementaranalyse liefert, nicht möglich.

Die fehlende weitere Information zur DS-Berechnung aus den Werten der Elementaranalyse erhält man aus den ^1H -NMR-Spektren der Produkte. Wie in Kapitel 3.1.1 bereits angesprochen, gehören die Peaks bei 3,2 ppm zur α - CH_2 -Gruppe des β -Alanins ($I_{\beta\text{-Alanin}}$) sowie die Signale zwischen 1,3-2,2 ppm zu den β -, γ - und δ - CH_2 -Gruppen von Lysin (I_{Lysin}). Das Verhältnis der Aminosäuren zueinander ($x = \beta\text{-Alanin:Lysin}$) errechnet sich aus:

$$x = \frac{\frac{I_{\beta\text{-Alanin}}}{2}}{\frac{I_{\text{Lysin}}}{6}}$$

Unter der Annahme, daß jedes Mol Aminogruppe mit einem halben Mol Schwefelsäure protoniert wird und mit Hilfe von

$$DS_{\beta\text{-Alanin}} = \frac{162 \cdot \frac{N\%}{100}}{14 + \frac{28}{x} - \frac{N\%}{100} \cdot \left(\frac{227}{x} + 121\right)}$$

Tabelle 3.15: Synthesebedingungen und resultierende DS für Dextran- β -Alanin-L-Lysin-Mischester

Probe	Molverhältnis AGE:CDI: β -Ala:Lys	x	DS $_{\beta-Ala}$	DS $_{Lys}$	DS $_{gesamt}$
14a	1:2:1:1	1,96	0,42	0,21	0,62
14b	1:3:2:1	3,6	0,68	0,19	0,87
14c	1:4:3:1	6,18	0,99	0,16	1,15
14d	1:3:1:2	1,11	0,43	0,39	0,82
14e	1:4:1:3	0,69	0,37	0,53	0,90

und

$$DS_{Lysin} = \frac{DS_{\beta-Alanin}}{x}$$

erhält man die DS-Werte der beiden Aminosäuren. Analog errechnet man die DS-Werte über Schwefel statt Stickstoff (siehe Tabelle 3.15).

Liegt L-Lysin nicht im Überschuß (1:3) vor, ist der Partial-DS von L-Lysin immer geringer als der von β -Alanin. Dies veranschaulicht die unterschiedlichen Neigungen der beiden Säuren, infolge unterschiedlicher Strukturen mit Dextran zum Ester zu reagieren (siehe Kapitel 3.2). Das sterisch gehinderte L-Lysin hat auch in den Homoestern (**6.***) immer einen geringeren DS-Wert erreicht als β -Alanin bei gleichen Molverhältnissen (**5.***). Als das größere Molekül ist L-Lysin auch insgesamt reaktionsträger, was ebenfalls zu den unterschiedlichen DS-Werten beiträgt.

Für beide Säuren resultieren steigende Partial-DS bei Erhöhung des molaren Verhältnisses. Im Falle von β -Alanin steigt der Partial-DS auf 0,99 beim Molverhältnis AGE:AS = 1:3, der Maximalwert des Partial-DS von L-Lysin liegt bei 0,53 und wird ebenfalls beim Molverhältnis 1:3 erreicht. Die DS-Gesamtwerte sind vergleichbar mit denen der Dextran-L-Lysinester und liegen unter denen der Dextran- β -Alaninester.

Die Ester wurden mit Hilfe der ^{13}C -Spektroskopie untersucht. Die Spektren entsprechen einer Überlagerung zweier entsprechender Spektren der jeweiligen Homoester (Abbildung 3.22). Die Überlegungen zur Zuordnung der Signale sind analog zu den in Kapitel 3.2 bereits dargelegten. Die Signale der AGE liegen in anderen ppm-Bereichen als die Signale der Substituenten. Die Signale der beiden Aminosäurereste sind im Bereich der CH_2 -

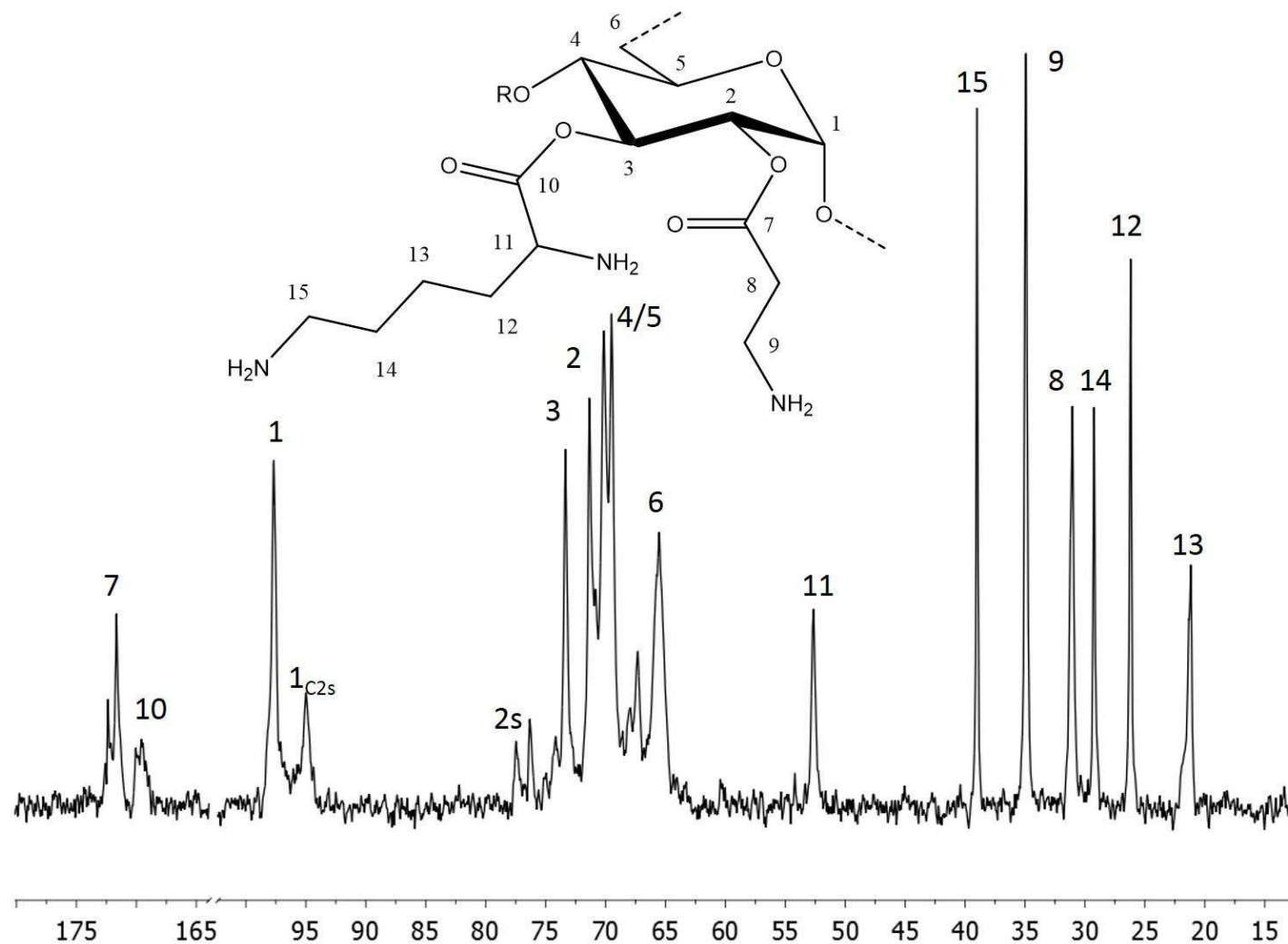


Abbildung 3.22: ^{13}C -NMR-Spektrum von Dextran- β -Alanin-L-Lysin-Mischester **14a** ($\text{DS}_{\beta\text{-Ala}}=0,42$; $\text{DS}_{\text{Lys}}=0,21$)

Gruppen gut voneinander getrennt und sogar die Signale der Carboxyfunktionen beider Säuren sind unterscheidbar, wie auch in Kapitel 3.2 beschrieben.

Im FTIR-Spektrum finden sich ebenfalls die erwarteten Signale. Die Carbonylbanden $\nu_{C=O}$, die sich für die β -Alanin- und L-Lysinester mit 1739 cm^{-1} bzw. 1754 cm^{-1} unterscheiden, sind nicht mehr getrennt voneinander, sondern bilden eine neue Bande bei 1743 cm^{-1} (Abbildung 3.23).

3.5.2 Untersuchungen zum Gentransfer

Die Dextran-Aminosäuremischester besitzen die günstigen Komplexbildungseigenschaften der Homoester, so daß sie bereits bei N/P-Verhältnissen von 1 nahezu vollständig die DNS binden. Desweiteren sind die Polyplexe positiv geladen und ihre hydrodynamischen Durchmesser liegen im Bereich von $75 \pm 4\text{ nm}$ bis $100 \pm 17\text{ nm}$, was sie für die Endozytose geeignet erscheinen läßt. Ein steigender absoluter β -Alaningehalt führt zu sinkenden Viabilitäten der murinen Fibroblasten und ein steigender absoluter L-Lysingehalt verschiebt die Höchstkonzentrationen, bei denen die 70 %-Grenze unterschritten wird, von $62,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ auf $125\text{ }\mu\text{g/mL}$. Bei der Erythrozytenaggregation profitieren die Polymere vom L-Lysingehalt bereits ab $DS_{L-Lysin}=0,16$ derart, daß bis zu Konzentrationen von $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ eine Stufe-3-Aggregation (starke Aggregation) ausbleibt. Gerade im Vergleich von Probe **14b** ($DS_{\beta-Alanin}=0,68$) zum reinen β -Alaninester mit vergleichbarem DS-Wert ($DS=0,69$; **12c**) zeigt sich der Einfluß des L-Lysins, wobei **14b** bei $12,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ leichte Aggregationen aufweist, **12c** bereits ab $1,56\text{ }\mu\text{g/mL}$. Bei den Hämolyseuntersuchungen sind alle Polymere nicht-hämolytisch mit Werten von $<2\%$ an zerstörten Erythrozyten. Durch die Kombination der zwei Aminosäuren β -Alanin und L-Lysin am Dextranrückgrat konnten die toxischen Eigenschaften im Vergleich zu reinen Dextran- β -Alaninestern reduziert werden.

Das besondere Merkmal der L-Lysin-Homoester im Gegensatz zu den β -Alaninestern waren die stabilen Komplexe, die einen effektiven Schutz vor dem Abbau der DNS durch DNase I gewährleisten konnten. Analog zu den Experimenten in Kapitel 2.1 wurden die Dextran-Aminosäuremischester mit N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 untersucht. Als Positivkontrolle diente DNS ohne Vektor, als Negativkontrolle unbehandelte DNS ohne DNase I. In Abbildung 3.24 sieht man, daß bis auf Verbindung **14e** keiner der Mischester in der Lage ist, DNS ausreichend zu schützen. Dies hängt mit den niedrigen Partial-DS-Werten der beiden Aminosäuren zusammen, die geringer sind als die für den effektiven Schutz notwendigen von $DS_{\beta-Alanin} \geq 1,50$ und $DS_{L-Lysin} \geq 0,61$ (Kapitel 2.1). In Mischester **14e** nähert sich der Partial-DS von L-Lysin dieser Grenze an und infolge

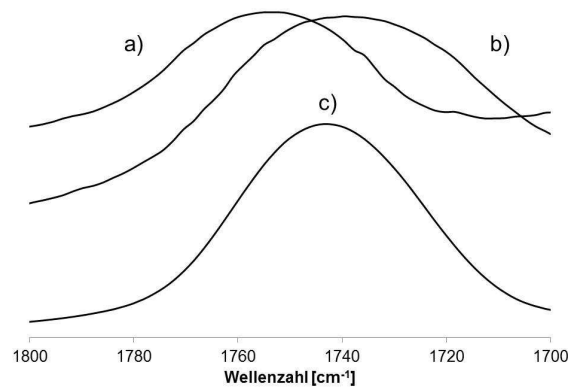


Abbildung 3.23: Vergrößerte Darstellung der Carbonylbanden $\nu_{C=O}$ a) eines Dextran-L-Lysinesters, b) eines Dextran- β -Alaninesters und c) eines Mischesters beider Aminosäuren

Probe		14a	14b	14c	14d	14e
DNS	DS _{β-Ala/Ly}	0,42/0,21	0,68/0,19	0,99/0,16	0,43/0,39	0,37/0,53
	N/P	10 20 40	10 20 40	10 20 40	10 20 40	10 20 40
unbe-						
handelt						
be-						
handelt						
+						
DNase						

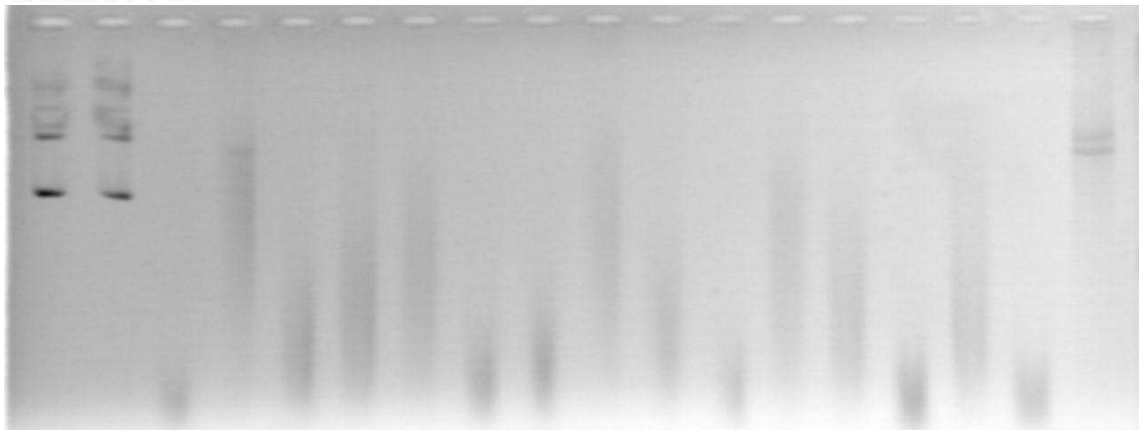


Abbildung 3.24: Fotografie der Agarosegele nach Experimenten zum Schutz vor Abbau von Plasmid-DNS durch DNase I mit Dextran- β -Alanin-L-Lysin-Mischestern verschiedener DS-Werte und N/P-Verhältnisse

dessen zeigt der Mischester einen Schutz vor DNase I, wie der Homo-L-Lysinester mit vergleichbarem DS bei einem N/P-Verhältnis von 40. Die ungenügend stabile Komplexbildung von Homo- β -Alaninestern mit vergleichbaren DS-Werten wird so verbessert.

Um herauszufinden, ob sich nur die positiven Eigenschaften der L-Lysinester auf die Mischester übertragen lassen oder die ungewünschten, geringen Transfektionseffizienzen infolge der hohen pK_a -Werte der ϵ -Aminogruppen und der niedrigen der α -Aminogruppen, wurde die Transfektion der Mischester ebenfalls untersucht.

Auch diese Experimente verliefen analog zu denen in Kapitel 2.1 beschriebenen. Die N/P-Verhältnisse der Polyplexe lagen bei 10, 20 und 40 und die Inkubationszeit mit den CHO-K1-Zellen lag bei 48 Stunden. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Eigenschaften der Homoester kommen bei der Transfektion zum Tragen: Mit steigendem Partial-DS an L-Lysin konnte keine Steigerung der Transfektion erreicht werden, wenn der Partial-DS von β -Alanin gleich bleibt (**14a**, **14d**, **14e**). Steigt jedoch der Partial-DS von β -Alanin, erhöht sich auch die Transfektionseffizienz (**14a-c**). Dabei weist Probe **14c** den höheren Wert (269366 ± 64752 RLU/ μ g Protein) auf, im Vergleich zum β -Alaninester mit gleichem Gesamt-DS (54388 ± 31512 RLU/ μ g Protein), aber höherem Partial-DS an β -Alanin (**12c**, Tabelle 3.14). Die Kombination beider Aminosäuren am Dextran führt somit zur Verbesserung der Eigenschaften im Vergleich zu den Homoestern. Die Transfektion ist außerdem vom N/P-Verhältnis abhängig, so daß mit N/P=40 die höchste Transfektion erreicht wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Kombination der zwei Aminosäuren β -Alanin und L-Lysin in einem Dextran-Mischester für die Eigenschaften beim Gentransfer eine vielversprechende Strategie ist. Die resultierenden Polymere haben die hohe Transfektionseffizienz der β -Alaninester, wobei ein geringer Gehalt an L-Lysin diese noch verstärkt. Außerdem erlaubt ein Mindestgehalt an L-Lysin von $DS_{L-Lysin} \geq 0,53$ es, auch schon bei geringeren Partial-DS an β -Alanin als 1,50 effektiven Schutz vor dem Abbau durch DNase I im Vektor zu haben. Darüber hinaus zeigen die Mischester eine verringerte Toxizität gegenüber den reinen β -Alaninestern.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Gentransfer, analog denen der Homoester, sind bei Zink^[164] detailliert zu finden.

3.6 Reaktionen mit ungeschützten Aminosäuren

Im Sinne des Aufstellens von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen ist es sinnvoll, kontrollierte Reaktionen mit *oligo*-funktionalen Molekülen durchzuführen, indem man die

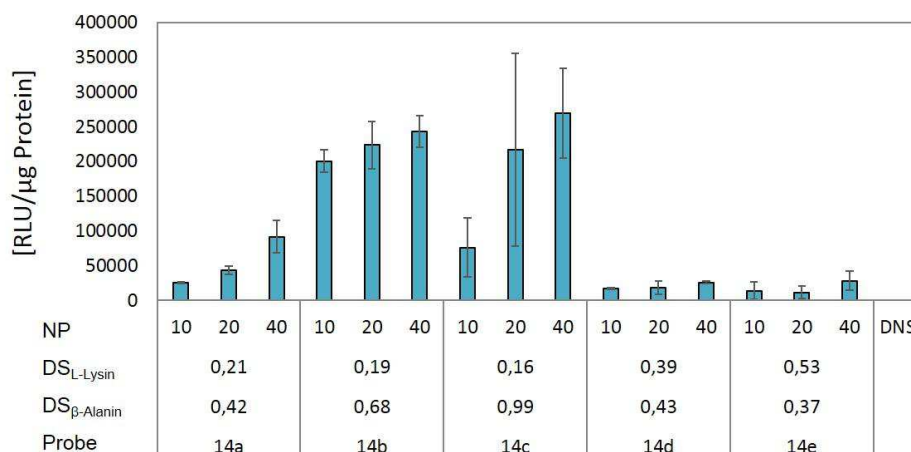


Abbildung 3.25: Transfektion der Mischester

nicht zur erwünschten Reaktion beitragenden funktionellen Gruppen durch Schützen der Reaktion entzieht, wie das in Kapitel 3.1 getan wurde, um zu einheitlichen Dextran-Aminosäureestern zu gelangen. Es ist bekannt, daß Aktivierungsmittel für Carboxylfunktionen für ungeschützte Aminosäuren Wege für alternative Reaktionen eröffnen. CDI reagiert nicht nur mit Carboxylgruppen, sondern als starkes Elektrophil kann der Carbonylkohlenstoff auch von den nukleophilen Hydroxyl- und Amingruppen angegriffen werden, wobei man Carbonate oder Harnstoffe erhält.^[106] In α -Aminosäuren greift CDI zuerst die Aminogruppe an, um dann mit der Carboxygruppe ein N-Carboxyanhydrit zu bilden.^[6] Diese können unter entsprechenden Bedingungen hydrolytisch gespalten werden und dann die Oligomerisierung mit anderen N-Carboxyanhydriten einleiten (Abbildung 3.26). Auf diese Art ist auch Copolymerisation von verschiedenen α -Aminosäuren möglich.^[91] β -Aminosäuren werden wegen der ungünstigeren 6-Ringstrukturen der theoretischen N-Carboxyanhydrite und des Zerfalls zu β -Isocyanatsäuren mit CDI nicht oligomerisiert. Liu *et al.*^[6] zeigen aber am Beispiel der Aktivierung der Carboxylgruppe mit einem Carbodiimid, daß wiederum Aktivierungsreagenzien, die vorzugsweise an der Carboxyfunktion angreifen und nicht an der Aminogruppe, β -Aminosäuren oligomerisieren können, indem die aktivierten Säuren Aminofunktionen anderer Säuremoleküle angreifen.

Die Reaktion von β -Aminosäuren mit Iminiumchloriden kann bei Reaktion mit der Carboxygruppe zur aktivierten Säure^[7] und bei Reaktion mit der Aminogruppe zu Amidinen führen, bei denen die Oligomerisierung oder Veresterung blockiert sein können. Diese niedermolekularen Bestandteile wie auch nicht an das Polymerrückgrat substituierte

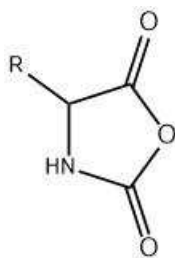


Abbildung 3.26: Struktur eines N-Carboxyanhydrides einer α -Aminosäure

Oligopeptide werden durch die Aufarbeitung aus der Reaktionsmischung entfernt.^[165] Entsprechend diesen Erkenntnissen wurde β -Alanin mit Iminiumchlorid in DMF/LiCl/DMAc und L-Lysin mit CDI in DMSO bzw. Imidazol umgesetzt. Die Vorgehensweisen sind identisch zur Veresterung mit Boc-geschützten Aminosäuren, wie in Kapitel 3.1 beschrieben.

3.6.1 Dextran-(oligo-L-Lysin)-ester

Bei der Reaktion wurden zur Aktivierung aller funktionellen Gruppen der Aminosäure 3 Mol CDI mit einem Mol L-Lysin umgesetzt. Auf diese Art wurde ausgeschlossen, daß funktionelle Gruppen, die mit CDI langsamer reagieren, bei der Reaktion diskriminiert und nicht einbezogen werden.

Nach der Reaktion in DMSO bei 80°C und 16 h erfolgte die Aufarbeitung nach Ausfällen des Produkts in Ethylacetat, indem der Niederschlag in Wasser aufgeschlämmt und beide Phasen zusammen dialysiert wurden. Es folgten Filtration und getrennte Trocknung von Filterkuchen und Filtrat. Es finden sich in beiden Phasen Rückstände von Imidazol, was sich im ^{13}C -NMR-Spektrum der löslichen Phase belegen läßt und zu teilweise sehr hohen Stickstoffgehalten in der Elementaranalyse führt. Aufgrund der sehr geringen Mengen an löslicher Phase wurde auf einen weiteren Dialyseschritt verzichtet, so daß die Aussagen zum molaren Substitutionsgrad (MS) begrenzten Wert haben. Der MS-Wert errechnet sich analog dem DS-Wert aus den Stickstoffwerten der Elementaranalyse und wird durch stickstoffhaltige Verunreinigungen verfälscht.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden bei der Reaktion in Imidazol bereits nach dem Ausfällen in Ethylacetat die Phasen durch Filtration nach Aufschlämmen in Wasser getrennt und separat dialysiert und getrocknet. Man erkennt hier in den Produkten **16.a-d**, daß mit steigendem Molverhältnissen ein steigender molarer Substitutionsgrad erreicht wird. Dabei enthalten die löslichen Anteile der Produkte immer geringere Werte

Tabelle 3.16: Bedingungen der Reaktionen von Aminosäuren, sowie Eigenschaften der Produkte

Probe	AS	Molverhältnis AGE:AS:AR	Lösungs- mittel	Aktivierungs- reagenz	Reaktions- zeit [h]	Reaktions- temperatur [°C]	MS	Löslich- keit H ₂ O	DS
15a	L-Lysin	1:1:3	DMSO	CDI	18	80	0,49	+	-
15.1b	L-Lysin	1:2:6	DMSO	CDI	18	80	0,31	+	-
15.2b	L-Lysin	1:2:6	DMSO	CDI	18	80	3,40	-	-
15c	L-Lysin	1:3:9	DMSO	CDI	18	80	3,26	-	-
15.1d	L-Lysin	1:4:12	DMSO	CDI	18	80	9,57	+	-
15.2d	L-Lysin	1:4:12	DMSO	CDI	18	80	2,02	-	-
16a	L-Lysin	1:1:3	Imidazol	CDI	1	100	0,25	+	-
16b	L-Lysin	1:2:6	Imidazol	CDI	1	100	0,40	+	-
16.1c	L-Lysin	1:3:9	Imidazol	CDI	1	100	0,82	+	-
16.2c	L-Lysin	1:3:9	Imidazol	CDI	1	100	1,08	-	-
16.1d	L-Lysin	1:4:12	Imidazol	CDI	1	100	1,16	+	-
16.2d	L-Lysin	1:4:12	Imidazol	CDI	1	100	1,52	-	-
17a	β -Alanin	1:1:2	DMAc/DMF	Iminiumchlorid	16	RT	-	+	0,11
17b	β -Alanin	1:2:4	DMAc/DMF	Iminiumchlorid	16	RT	-	+	0,40
17c	β -Alanin	1:3:6	DMAc/DMF	Iminiumchlorid	16	RT	-	+	0,55
17d	β -Alanin	1:4:8	DMAc/DMF	Iminiumchlorid	16	RT	-	+	0,76

Spezieller Teil

Stickstoff als die bei gleichen Bedingungen anfallenden unlöslichen Produkte, sie unterscheiden sich jedoch nur geringfügig ($\Delta DS_{max}=0,36$). Da die unlöslichen Produktanteile sich nicht für die Aufnahme von NMR-Spektren eignen, kann über das Vorliegen von Imidazol keine Aussage getroffen werden. Im Resultat ist für die Löslichkeit nur der Grad der Vernetzung wichtig, nicht der Substitutionsgrad. Die FTIR-Spektren der Phasen unterscheiden sich nicht voneinander (Abbildung 3.27). Es finden sich drei Carbonylbanden bei 1777 cm^{-1} , 1714 cm^{-1} sowie 1651 cm^{-1} . Eine (1777 cm^{-1}) davon ist die verschobene Esterbande, eine (1714 cm^{-1}) wurde nach Auswertung der Ergebnisse der NMR-Spektroskopie einem Harnstoff zugeordnet (s.u.) und bei der dritten (1651 cm^{-1}) handelt es sich um die Amid-I-Bande.

Die Verschiebung der Esterbande kommt durch eine Änderung der elektronischen Umgebung im Vergleich zum Homoester (Tabelle 3.7) zustande, da davon auszugehen ist, daß in α -Position eine Amidbindung gebildet wurde. Nach Liu *et al.*^[6] erwartet man in der Reaktionsmischung vor Zugabe des Dextrans einen hohen Anteil oligomerisierten L-Lysins, bei dem am Carboxyende noch eine aktivierte Gruppe vorliegt. In der Folge verankern diese wenigen Carboxygruppen das Oligomer über eine Esterbindung am Dextran. Die an der Bildung des N-Carboxyanhydrids^[6] durch ihren räumlichen Abstand nicht beteiligten ϵ -Aminogruppen reagieren miteinander. Die an den Oligomeren verbliebenen α -Aminogruppen reagieren nach Staab^[106] zum Harnstoff, wobei CDI die Carbonylkomponente liefert und zwei Mol Imidazol entstehen.

Um die Struktur dieser Verbindungen mittels NMR-Spektroskopie analysieren zu können, wurde die Reaktion mit einem relativ kurzen Dextran (6000 g/mol) in Imidazol studiert. Das Produkt hat einen MS von 1,73, ist aber trotz des hohen L-Lysingehaltes wasserlöslich.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abbildung 3.28) sind eine Vielzahl von verschiedenen Signalgruppen zu sehen. Die Signale von AGE und Substituent sind voneinander getrennt. Die AGE ist dabei so gering substituiert, daß sich im Gegensatz zum Dextran-L-Lysinester (Abbildung 3.8) keine Signale für $\text{C}2_s$ und die benachbarten Signale für $\text{C}1_{\text{C}2_s}$ und $\text{C}3_{\text{C}2_s}$ finden. Das Signal $\text{C}6'$ für die unsubstituierten Endgruppen ist ebenfalls bei 62,9 ppm zu sehen. Dies und das Fehlen einer Wechselwirkung in 2D-NMR-Spektren wie dem ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum zwischen Substituent und der AGE lassen auf einen sehr geringen DS schließen beim vergleichsweise hohen MS von 1,73.

Der Substituent zeigt viele Signale, was der Vielzahl an möglichen Reaktionen nach Aktivierung durch CDI entspricht. Es finden sich für den Substituenten 7 Signalgruppen: Im Bereich der Carbonylkohlenstoffe gibt es ein dominantes Signal bei 177,8 ppm ($\text{C}7$), das

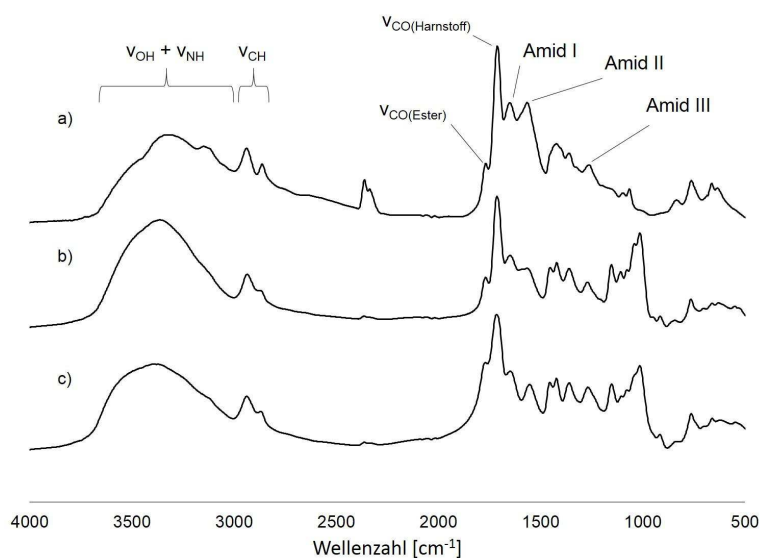
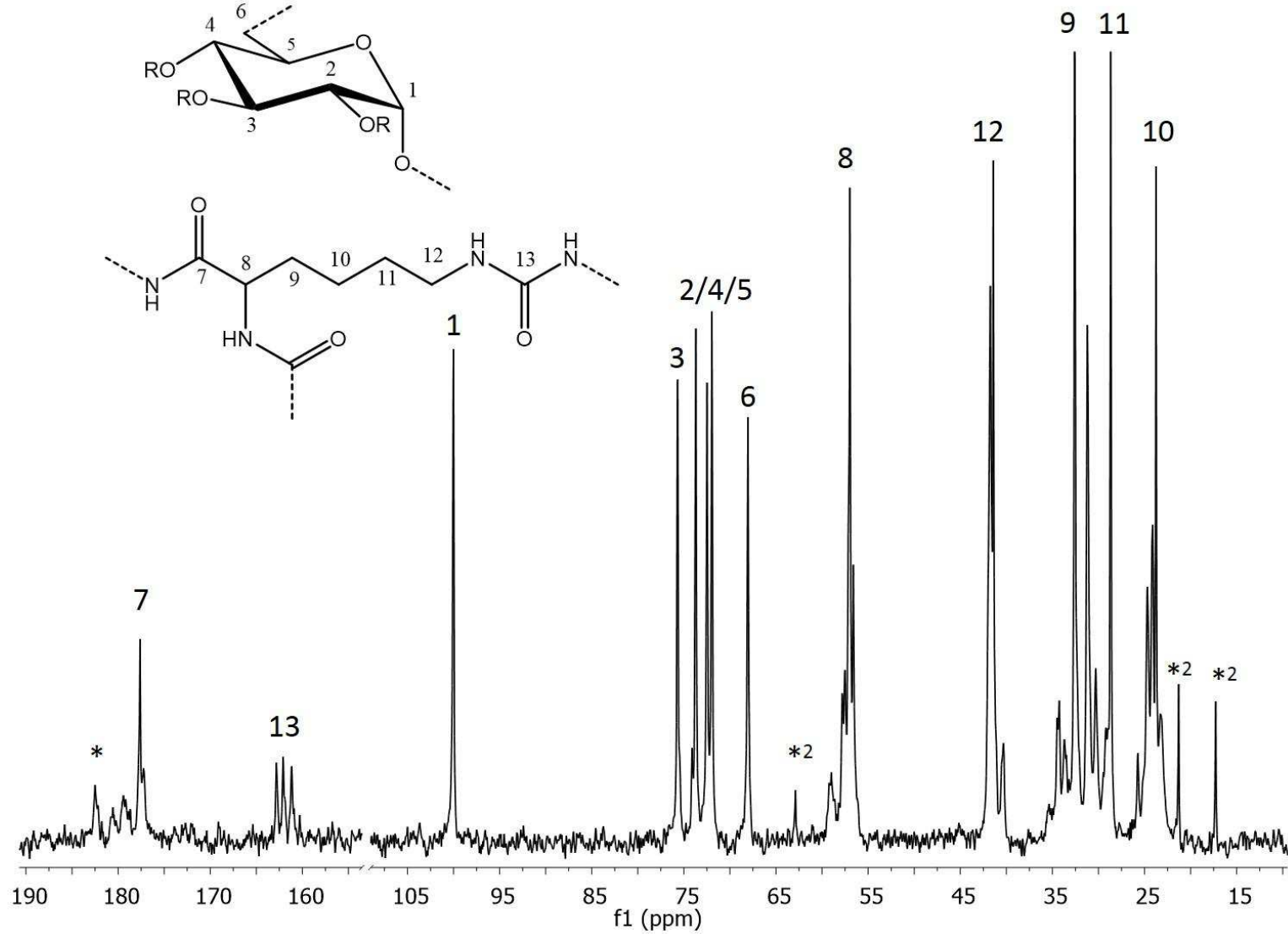


Abbildung 3.27: FTIR-Spektren a) einer löslichen Fraktion eines in DMSO synthetisierten (**15.1d**), b) einer löslichen Fraktion eines in Imidazol synthetisierten (**16.1d**) und c) einer unlöslichen Fraktion eines in Imidazol synthetisierten Dextran-(*oligo*-L-Lysin)-esters (**16.2d**)

Tabelle 3.17: Ausgewählte FTIR-Signale und ihre Zuordnung für Dextran-(*oligo*-L-Lysin)-ester

Schwingung	Wellenzahl [cm ⁻¹]
ν_{OH}	3650-3200
ν_{NH}	3500-3300
$\nu_{C=O(Ester)}$	1777
$\nu_{C=O(Harnstoff)}$	1714
Amid I	1651
Amid II	1566
Amid III	1244
$\nu_{C-O(H)}$	1041



*Carbonylkohlenstoff der Säure, *2Ethylacetat

Abbildung 3.28: ^{13}C -NMR-Spektrum eines Dextran-(*oligo*-L-Lysin)-esters (DS=1,73)

im ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum (Abbildung 3.29) mit den Protonen (3,7 ppm) einer CH-Gruppe über drei Bindungen wechselwirkt. Die einzige Methingruppe am L-Lysin befindet sich am α -Kohlenstoff. Das Signal resultiert aus einem Carbonylkohlenstoff eines L-Lysin-Moleküls, der an der α -Aminogruppe eines weiteren L-Lysin-Moleküls als Amid gebunden ist. Die mit der Amidbindungsknüpfung verbundene Oligomerisierung ist also eine der Hauptreaktionen unter den gewählten Bedingungen.

Im Bereich von ca. 175-183 ppm gibt es noch weitere Carbonylsignale, für die keine Wechselwirkungen gefunden wurden. Bei ihnen handelt es sich wahrscheinlich um eine geringere Anzahl Amidsignale, die durch die Beteiligung von Carbonylkohlenstoffen von Estern oder durch Amidbindungen mit ϵ -Aminogruppen entstehen. Außerdem sind auch unsubstituierte Carboxylgruppen am Kettenende denkbar. Im Bereich 172-175 ppm liegen schwache Signale, die auf wenige Esterbindungen ohne α -Amidbindung schließen lassen.

Die zweite Signalgruppe mit drei Signalen liegt im Bereich 160-163 ppm. Es handelt sich hierbei um Carbonylkohlenstoffatome von Harnstoffstrukturen. Zwei Signale zeigen jeweils eine Wechselwirkung mit einem Proton in ϵ -Stellung (H_ϵ) des Lysins, wobei das wesentlich stärkere bei 3,05 ppm liegt, das andere bei 3,48 ppm. Bereits Staab^[106] zeigte die vielseitige Chemie von CDI auf: die von der Oligomerisierung nicht betroffenen ϵ -Aminogruppen sowie die α -Aminogruppen am Ende eines Oligomers können mit CDI durch Übertragung des Carbonylkohlenstoffs zu Harnstoffderivaten reagieren. Da nur für zwei der drei Signale eine zugehörige ϵ -Aminogruppe gefunden wurde, kann es sich hierbei um ϵ -, ϵ -, ϵ , α - und α , α -Verknüpfungen handeln, wobei erstere die wahrscheinlichste sein dürfte, da die ϵ -Aminogruppen nach Liu *et al.*^[6] nicht an der Oligomerisierung beteiligt sind. Alternativ kann es sich auch bei einem dieser Signale um einen Carbamatcarbonylkohlenstoff handeln, der in Konkurrenz zur Veresterung mit den Hydroxygruppen des Dextrans auf eine weitere Substitutionsreaktion verweist. Außer den Carbonylsignalen im richtigen Bereich gibt es jedoch keinen Hinweis darauf. Von Staab selbst nicht beschrieben, sind Reaktionen von Hydroxy- und Aminogruppen mit CDI unter Bildung von Carbamaten sowohl intramolekular^[166] als auch intermolekular^[167] bekannt. Da Dextran der Reaktionslösung erst nach Aktivierung, also dem fast vollständigen Verbrauch des Aktivierungsmittels CDI, zugegeben wird, ist die Möglichkeit dieser Reaktion jedoch sehr unwahrscheinlich.

Im Bereich 56-60 ppm liegen drei Signale, die nach ^1H , ^{13}C -HSQC-DEPT-NMR-Spektrum jeweils einer Methingruppe zugehörig sind. Wie bereits erläutert, handelt es sich hier um verschiedene Spezies von C_α . Das dominante C_α -Signal bei 57,2 ppm (C8) korreliert mit

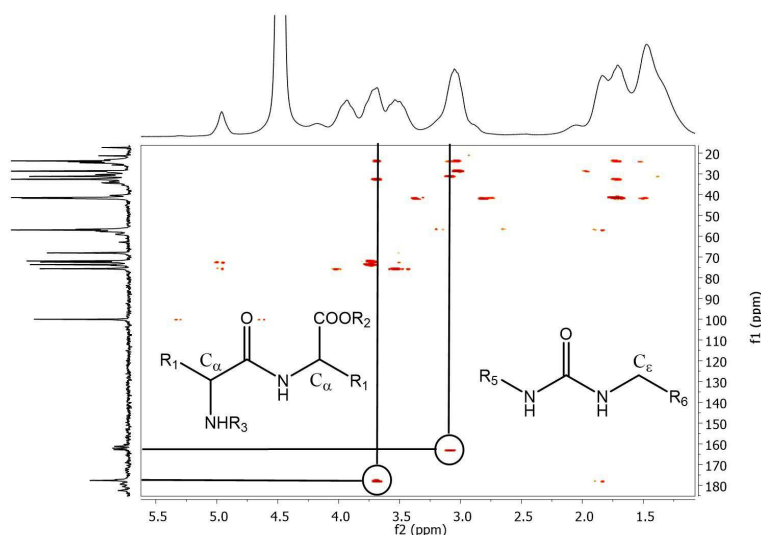


Abbildung 3.29: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum eines Dextran-(*oligo*-L-Lysin)-esters (DS= 1,73) und Markierung der Wechselwirkungen des Amidcarbonylkohlenstoffs sowie des Harnstoffcarbonylkohlenstoffs

dem bereits erwähnten Proton bei 3,7 ppm.

Ausgehend von diesem Signal kann man mit Hilfe der Wechselwirkungen von Protonen an benachbarten Kohlenstoffen im $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum (Abbildung 3.30) und dem $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-DEPT-NMR-Spektrum das vermutlich häufigste Element in den Oligomeren nachweisen: ein auf der einen Seite in ein Peptid per Amidbindungen und mit der ϵ -Aminogruppe in einen Harnstoff eingebautes Lysin (C7 177,8 ppm/C8 57,2/C9 32,8/ C10 23,8/C11 28,8/C12 41,93). Fragmente elektronisch verschiedener, also auch anders ins Oligomer eingebauter Lysine lassen sich außerdem auf die gleiche Art nachweisen: ein C_α (58,3/3,97) an C_β (34,4/1,69), zwei C_γ (25,0/1,33 und 23,0/1,31) an C_δ (31,4/1,46) und ein C_δ (31,4/1,46) auf C_ϵ (41,9/3,01). Diese Wechselwirkungen werden zusätzlich durch die Ergebnisse eines $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -H2BC-NMR-Experiments untermauert.

Die auf diese Art synthetisierten Produkte sind, wie nun dargelegt, strukturell sehr vielseitig. Sie kommen durch mindestens drei von CDI katalysierte Reaktionen zustande, die alle in unterschiedlichem Maße stattfinden:

- die Peptidbindung einer Carboxylgruppe und einer α -Aminogruppe unter Bildung des N-Carboxylanhydrits nach Liu *et al.*^[6],
- die Harnstoffbildung hauptsächlich von ϵ -Aminogruppen untereinander mit Carbonylübertragung vom CDI auf die Aminogruppen nach elektrophilem Angriff^[106] und

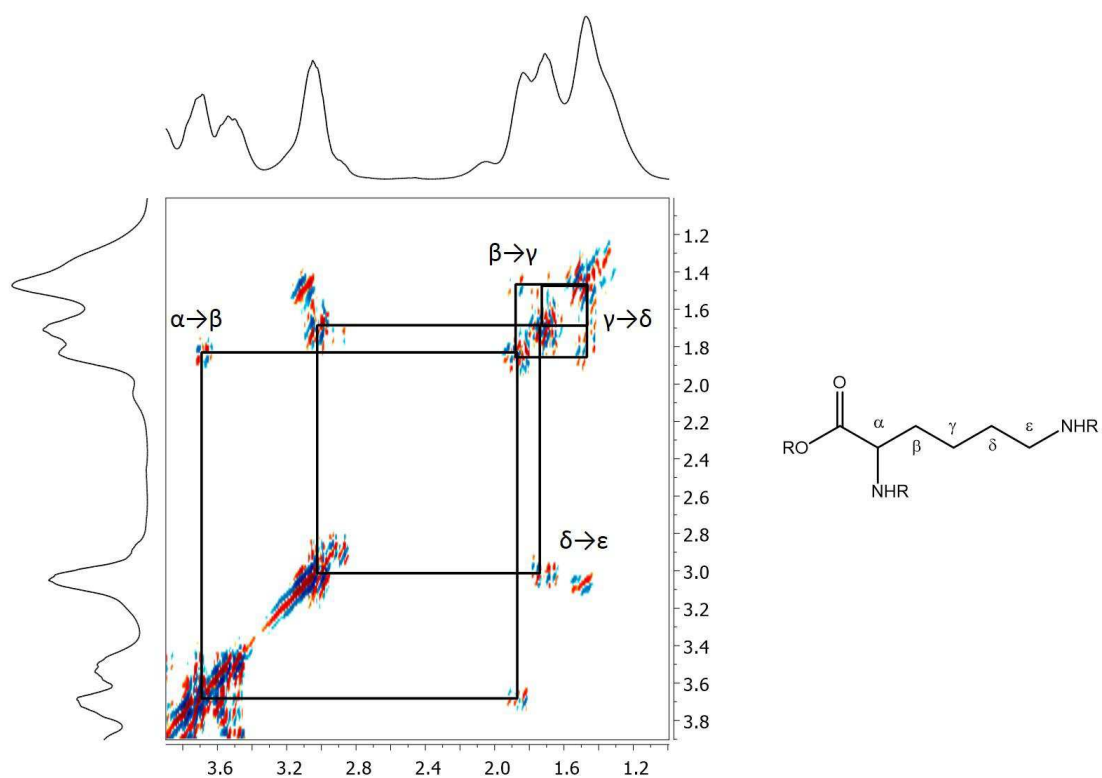


Abbildung 3.30: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum eines Dextran-(*oligo*-L-Lysin)-esters (DS= 1,73) und Markierung der Wechselwirkungen des dominanten L-Lysin-Rückgrates

- c) die für die Substitution notwendige Esterbildung mit dem Polymerrückgrat.

Zusätzliche Reaktionen können die Carbamatbildung zwischen Aminogruppen des Lysins und Hydroxygruppen des Dextrans, sowie Amidbildung der ϵ -Aminogruppen sein. Durch das Einstellen des Molverhältnis AS:AR auf 1:3 wird keine dieser Reaktionen diskriminiert. Als Resultat erhält man keine strukturell eindeutig definierten Verbindungen sondern vernetzte und verzweigte Verbindungen mit geringem DS, aber hohem MS und unterschiedlichen Anteilen an verschiedenartig gebundenem L-Lysin. Daher können keine Struktur-Eigenschafts-Beziehungen abgeleitet werden.

3.6.2 Dextran-N-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester

Bei dieser Reaktion wurde ein Molverhältnis AS:AR auf 1:2 gewählt, um alle funktionellen Gruppen umzusetzen und die Begünstigung einer funktionellen Gruppe zu verhindern. Die Molverhältnisse AGE:AS variierten wie bei den Synthesen der Homoester zwischen 1:1-1:4. Aktivierter funktioneller Gruppen und überschüssiges Iminiumchlorid zersetzten sich beim Lösen des Polymers in Wasser und wurden durch die anschließende Dialyse wie alle niedermolekularen Verbindungen auch abgetrennt. Das Reaktionsschema und die Struktur der Produkte sind in Abbildung 3.31 zu sehen.

Die Aufklärung der Struktur der so erhaltenen Produkte erfolgte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind die Signale von AGE und Substituent gut getrennt (Abbildung 3.32). Die AGE liegt im Bereich von 60-100 ppm. Zusätzlich zu den Signalen der unsubstituierten AGE (s. Kapitel 3.2) sind Signale zu sehen, die aufgrund ausreichender Substitution zustandekommen: vor allem $\text{C}2_s$ bei 76,5 ppm und dazu benachbart $\text{C}1_{\text{C}2_s}$ (96,0 ppm) und $\text{C}3_{\text{C}2_s}$ (68,0 ppm), das im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY-NMR-Spektrum mit dem Proton von $\text{C}2_s$ wechselwirkt. Es handelt sich dabei um Esterbindungen, das Carbonylsignal liegt bei 172,4 ppm. Im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum konnte nicht, wie bei einigen der Homoester, eine Wechselwirkung zwischen Substituent und Polymerrückgrat über den Carbonylkohlenstoff des Esters und das Proton an der AGE nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.7), da durch die Dialyse der Produkte mit Dialysesläuchen einer *cut off*-Masse von 3500 g/mol die Produkte, deren Rückgrat kurz genug für eine derartige Anregung im NMR-Spektrum ist, entfernt wurden. Das Erscheinungsbild der AGE und die Positionen der Signale belegen jedoch die Esterbildung.

Weitere Signale der AGE sind die der unsubstituierten Endgruppen in den Verzweigungen am Kohlenstoff $\text{C}6'$ bei 61,1 ppm, den man nur bei niedrigen DS-Werten findet ($\text{DS} \leq 0,4$) und der substituierten Endgruppen $\text{C}6'_s$ bei 63,6 ppm, die sich von anderen

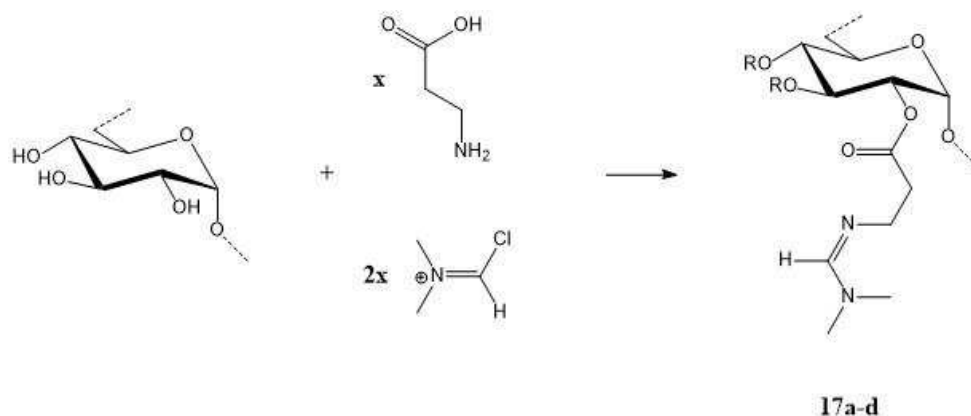


Abbildung 3.31: Reaktionsschema der Synthese der Dextran-*N*-[(Dimethylamino)methylen]- β -Alaninester

Signalen im DEPT135-NMR-Spektrum als CH_2 -Gruppen unterscheiden.

Neben den bereits erwähnten Carbonylsignalen des Esters bei 172,4 ppm findet sich bei 156,7 ppm ein Signal einer Methingruppe. Methylgruppen, die im DEPT135-NMR-Experiment die gleiche Polarität haben, finden sich nicht in dem ppm-Bereich. Das ^{13}C -Signal bei 156,7 ppm korreliert im ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum mit dem Protonensignal bei 8,14 ppm. Im ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum (Abbildung 3.33) koppelt wiederum dieses Signal über drei Bindungen mit den Kohlenstoffen zweier Methylgruppen (43,4 ppm und 35,2 ppm), sowie einer Methylengruppe bei 42,8 ppm, bei der es sich um den β -Kohlenstoff des β -Alanin-Restes handelt. Das Signal für die zugehörige α -Methylgruppe liegt bei 34,7 ppm bzw. 35,0 ppm. Es weist eine Aufspaltung auf, die auf die unterschiedlichen elektronischen Umgebungen an den unterschiedlichen Positionen an der AGE zurückgeht. Bei der β -Methylengruppe ist diese Aufspaltung zwar auch zu finden, aufgrund der Entfernung zur Esterbindung jedoch nur gering.

Weitere im ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum auftretende Wechselwirkungen werden verursacht durch Korrelation über drei Bindungen von den Protonen des β -Kohlenstoff mit dem Carbonylkohlenstoff des Esters und dem Methinkohlenstoff bei 156,7 ppm, sowie dieses Kohlenstoffes mit den Methylgruppen bei 43,4 ppm und 35,2 ppm. Eine schwächere Wechselwirkung liegt zwischen den α -Protonen und der Carbonylgruppe des Esters vor.

Die der Amidgruppe benachbarten Methylgruppen sind in ihrer Rotation gehemmt, so daß sie sich im ^{13}C -NMR-Spektrum voneinander unterscheiden. Durch selektive Anregung im ^1H -NMR-Spektrum bei 8,14 ppm ergeben sich Wechselwirkungen des For-

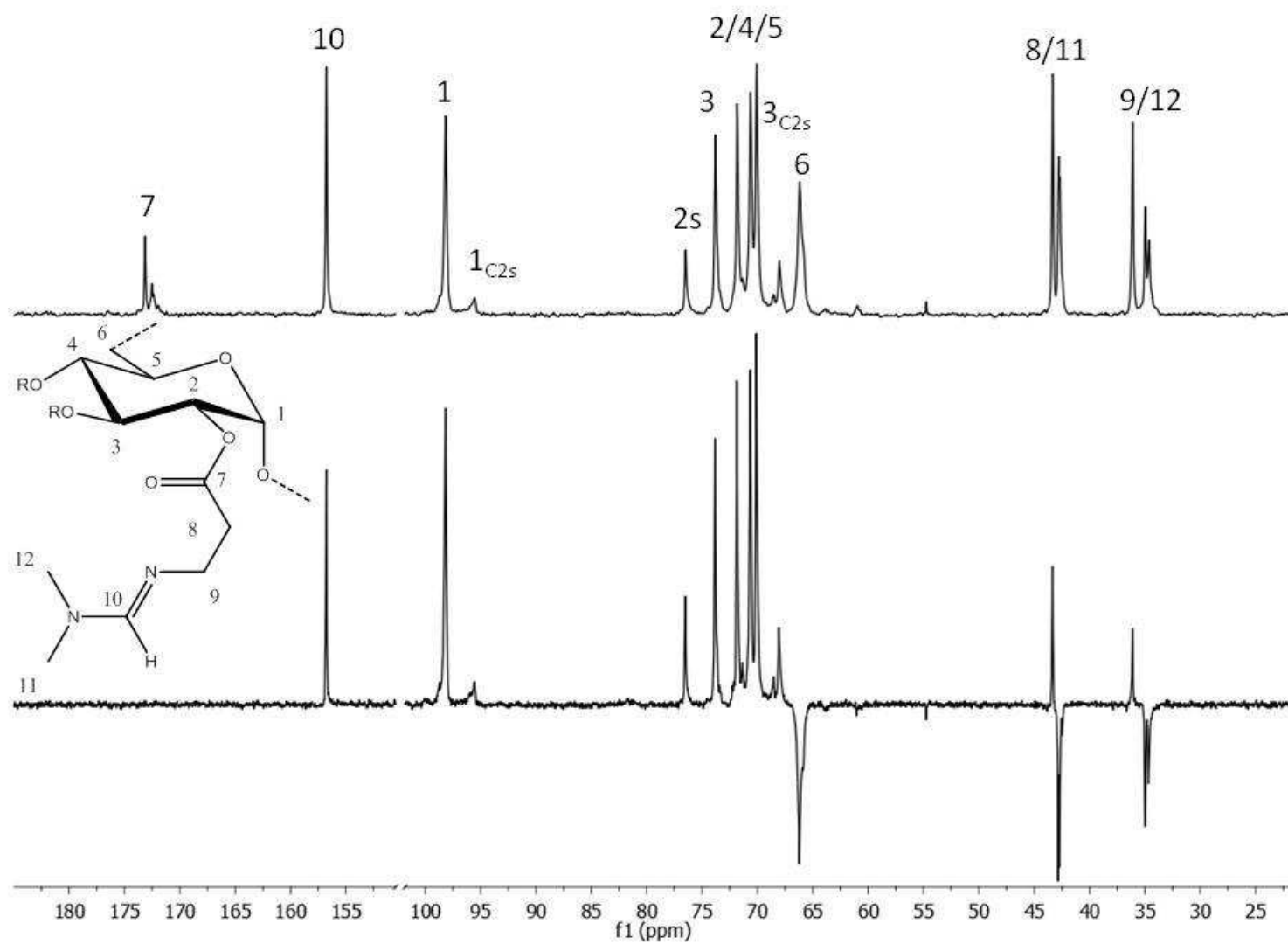


Abbildung 3.32: ^{13}C - und DEPT135-NMR-Spektrum eines Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninesters (**17b**, DS=0,40)

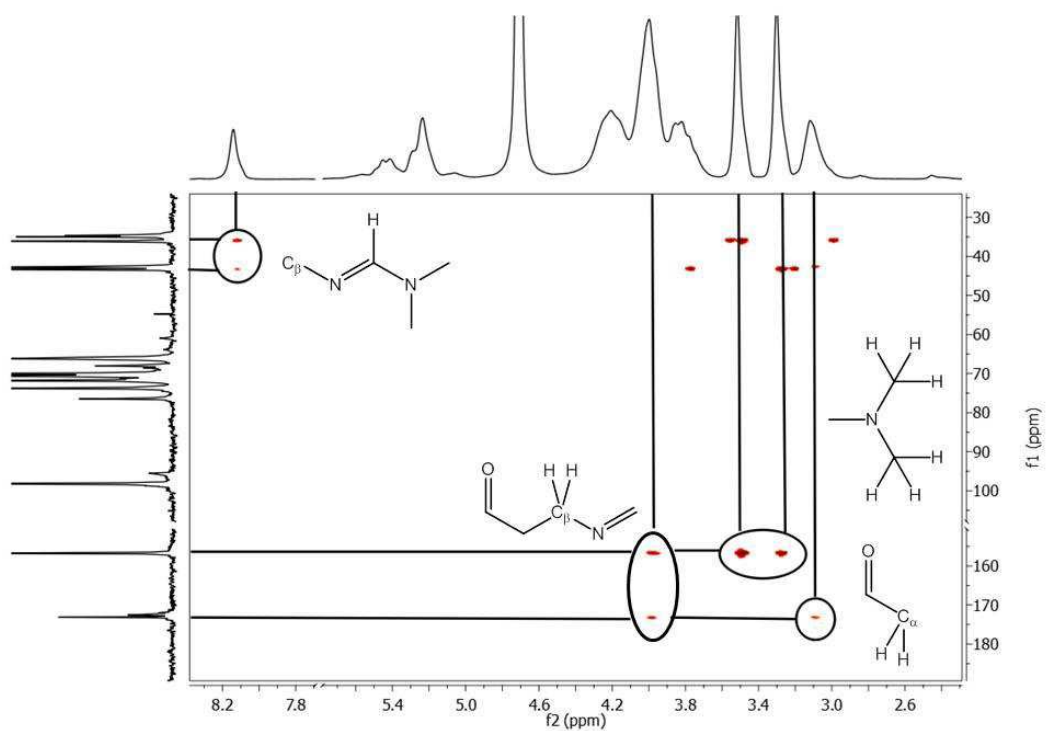


Abbildung 3.33: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum eines Dextran-*N*-[(Dimethylamino)methylen]- β -Alaninesters (**17b**, DS=0,40)

mamidinprotons mit den Protonen der zu diesem Proton in *cis*-Stellung stehenden Methylgruppe (43,4 ppm/3,62 ppm). Die Unterscheidbarkeit der beiden Methylgruppen im ^{13}C -NMR-Spektrum ist Ausdruck des Doppelbindungscharakters der C-N-Bindung in Amidinen.^[168] Dieser verhindert die freie Rotation der Methylgruppen und läßt diese unterscheidbar werden.

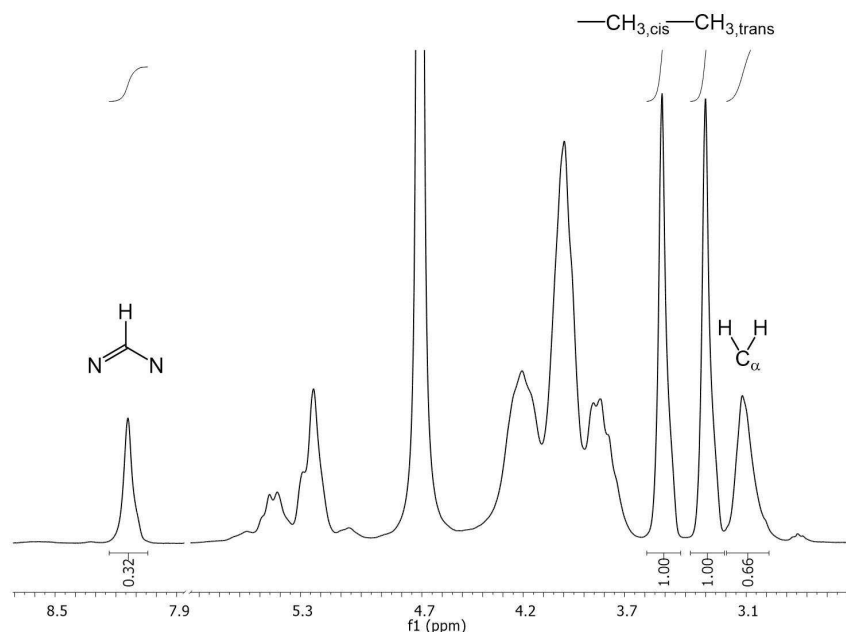
Aus den Ergebnissen dieser NMR-Experimente ergibt sich die in Abbildung 3.32 gezeigte Struktur der Produkte, die eines Formamidins an der Aminogruppe des als Ester am Dextranrückgrat gebundenen β -Alanins.

Die *in situ*-Aktivierung der α -Aminosäure L-Lysin lieferte in Übereinstimmung mit der Literatur^[6,106] Peptide, die über Harnstoffbrücken miteinander vernetzt und als Ester am Dextran gebunden sind. Ebenso in Übereinstimmung mit Liu *et al.* fand bei der *in situ*-Aktivierung von L-Lysin mit Iminiumchlorid keine Oligomerisierung statt, was auch bei der Reaktion von β -Alanin mit Iminiumchlorid gefunden wurde. Iminiumchlorid reagiert mit Glycin zu vielfältigen Produkten^[169,170], Reaktionen mit β -Aminosäuren sind jedoch nicht bekannt. Beim β -Alanin liegen die beiden funktionellen Gruppen soweit auseinander, daß Iminiumchlorid an beiden unabhängig voneinander elektrophil angreifen kann und sich die Reaktionen nicht beeinflussen, beispielsweise durch Bildung von Oligomeren.^[6] Stattdessen bildet sich an der Aminogruppe ein Formamidin und dieses Molekül wird über eine Esterbindung an das Polymerrückgrat substituiert. Wie aus den Integralen im ^1H -NMR-Spektrum hervorgeht (Abbildung 3.34), beträgt das Verhältnis Methylgruppe:Methylengruppe:Methingruppe 2:1:1. Daraus resultiert, daß alle Substituenten an der Aminogruppe zum Formamidin reagiert haben.

Die Reaktion von primären Aminogruppen mit Iminiumchlorid zum Formamidin ist bekannt^[171,172], kann ohne Chlorierungsreagenz ablaufen^[173] und findet auch bei Harnstoffen, also Amidin, oder Guanidinverbindungen statt.^[174,175] Die bifunktionale Struktur der β -Aminosäure beeinflußt hierbei jedoch die Reaktionen des Iminiumchlorids nicht. Sie laufen stattdessen wie bei einer vergleichbaren monofunktionalen Verbindung ab.

Vergleiche der NMR-Daten mit der Literatur^[171,175] bestätigen durch die Lage der extremen Signale des Formamidinkohlenstoffs sowie des -wasserstoffs (156,7 ppm/8,14 ppm) die ermittelte Struktur.

Im FTIR-Spektrum (Abbildung 3.35) findet sich bei 1712 cm^{-1} ein dominantes Signal, das sich mit Hilfe der Literatur als Valenzschwingung $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ bei 1712 cm^{-1} des Amidins identifizieren läßt^[176,177], in dessen Schulter, beim selben Wert wie den Homoestern (Kapitel 3.2), die Valenzschwingung $\nu_{\text{C}=\text{O}}=1739\text{ cm}^{-1}$ liegt. Daß sich weder der Wert dieser Schwingung im FTIR-Spektrum, noch der Wert des Carbonylkohlenstoffs des



cis/trans bezieht sich auf die Stellung zum Amidinproton

Abbildung 3.34: ^1H -NMR-Spektrum eines Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylene]- β -Alaninesters (**17b**, DS=0,40)

Esters im ^{13}C -NMR-Spektrum (172,4 ppm) geändert haben, zeigt die elektronische Unabhängigkeit der beiden funktionellen Gruppen im β -Alanin noch einmal, was auch die einander nicht hindernden Reaktionen der Formamidinbildung und der Veresterung plausibel macht. Die weiteren Signale des Esters finden sich bei 1184 cm^{-1} ($\nu_{as}(\text{C-O-C})$) und 1006 cm^{-1} (ν_{C-O}). Die Signale $\delta_{as/sy}$ der Aminogruppen treten nicht mehr auf. Nach Absichern der Struktur durch NMR- und FTIR-Spektroskopie ist es möglich, statt MS-Werten wie bei den Dextran-(*oligo*-Lysin)-estern DS-Werte mit den Werten der Elementaranalyse zu bestimmen (Tabelle 3.16). Die DS-Werte sind deutlich niedriger als für die reinen β -Alaninester mit 0,76 als höchstem erreichten Wert bei einem Molverhältnis von AGE:AS:AR=1:4:8. Eventuell sind diese geringen DS-Werte das Ergebnis der Oligomerisierung^[6], die ebenfalls stattfindet, die Veresterung aber ausschließlich mit den Formamidin- β -Alaninen erfolgt.

Für die Nutzung als Vektor beim Gentransfer ist der pK_a -Wert der Endgruppe von Interesse, die mit der DNS wechselwirken soll. Ist er zu gering wie bei α -Aminogruppen (3.2) oder zu hoch wie bei PLL^[39] gelingen aufgrund ungenügenden Protonierungsverhaltens beispielsweise Komplexbildung mit der DNS oder die endosomale Freisetzung nicht. Andererseits sind die positiven Eigenschaften von möglichen Vektoren nicht ausschließlich

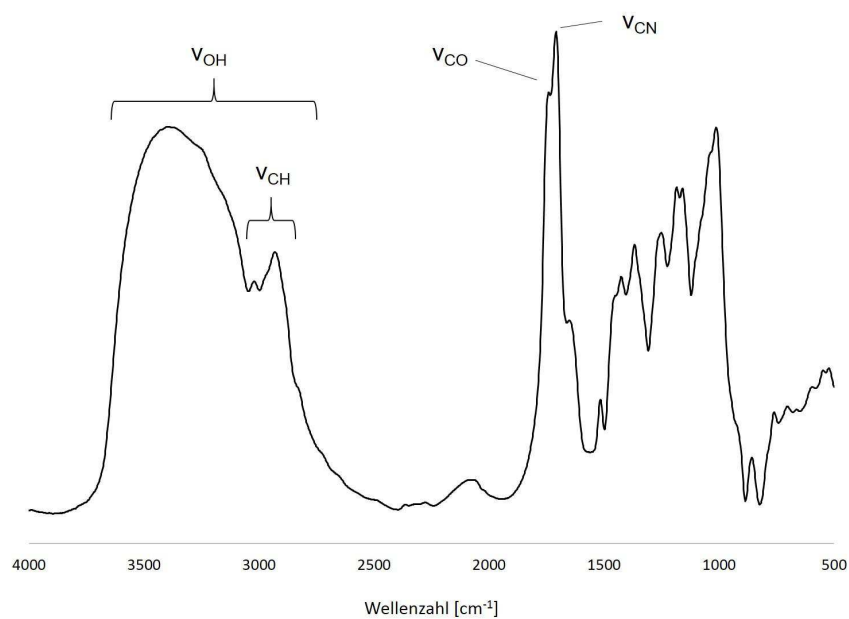


Abbildung 3.35: FTIR-Spektrum eines Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylene]- β -Alaninesters (**17d**)

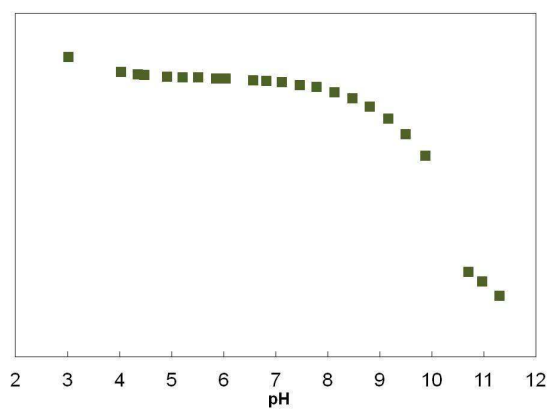


Abbildung 3.36: Ladungsisotherme eines Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylene]- β -Alaninesters mit DS=0,55 (**17c**)

vom pK_a -Wert des Amins abhängig^[62,178] und sogar die stark basische Guanidingruppe kann sich positiv auf die Transfektion auswirken.^[179]

Dazu wurden an Probe **17d** potentiometrische Titrationsen durchgeführt wie in Kapitel 3.3 bereits für die Dextran-Aminosäureester beschrieben. Abbildung 3.36 zeigt eine der resultierenden Isothermen. Als Resultat ergab sich ein pK_a -Wert der Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester von $pK_a=10,1$. Damit sind die Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester in ihrer Basizität mit den L-Lysinestern vergleichbar, die pK_a -Werte von 9,9 haben. Ihre Eignung als Vektoren im *gene delivery* ist damit zwischen den Polen PLL und guanidinhaltigen Substituenten anzusiedeln, da sich Formamidine formal vom Guanidin ableiten.

Statt der Ester von Dextran und verschiedenen langen Peptiden entstehen also bei der Aktivierung von β -Alanin mit Iminiumchlorid klar definierte Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester, die wasserlöslich sind, protonierbare Gruppen enthalten und sich daher für weitergehende Untersuchungen zum Gentransfer eignen.

3.6.3 Untersuchungen zum Gentransfer

An den Proben **17b-d** wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, an denen beispielhaft ihre Eignung als Vektoren untersucht werden sollte. Dabei wurden Bindungskapazität, Zellviabilität und Transfektionseffizienz in Experimenten getestet, die analog zu den in Kapitel 3.4 beschriebenen durchgeführt wurden. Probe **17a** wurde aufgrund ihres geringen DS-Wertes nicht betrachtet.

Bei der Komplexbildungskapazität mit Heringssperma-DNS zeigt sich, daß für stabile Komplexe, bei denen nur noch <5 % der DNS ungebunden vorliegen (LPEI, 2500 g/mol, <2 %, N/P=20), ein DS-Wert von >0,40 erforderlich ist. Polymere **17c** und **17d** binden entsprechend schon bei sehr niedrigen N/P-Verhältnissen ab N/P=2. **17b** erreicht zwar ähnlich gute Bindekapazitäten, jedoch erst bei N/P-Verhältnissen ≥ 40 , wenn genügend kationische Gruppen vorliegen. Der höhere DS-Wert von **17d** sorgt dabei für geringfügig höhere Bindekapazitäten bei N/P=2-40, die in maximal 4 % ungebundener DNS resultieren (N/P=5). In Abbildung 3.37 sind die Ergebnisse der drei Polymere in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis aufgeführt.

Die Polymere sind in der Lage Komplexe mit DNS zu bilden und diese auch zu kondensieren (>95 % gebundene DNS). Um jedoch als nicht-virale Vektoren in Frage zu kommen, müssen diese auch nicht-toxisch sein. Aus dem Gebiet der Toxizität/Hämokompatibilität wurde beispielhaft die Zelltoxizität getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 zu sehen. Der Zusammenhang zwischen DS und Zellviabilität zeigt sich auch hier: **17b** ist

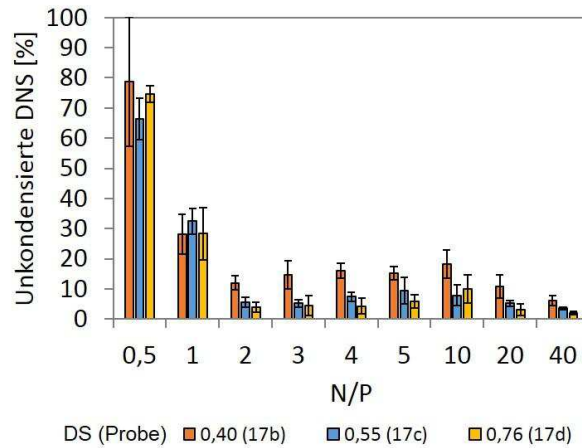


Abbildung 3.37: DNS-Bindungs Kapazität der Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methyl]- β -Alaninester bei verschiedenen N/P-Verhältnissen

bis zu einer Konzentration von 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ als nicht-toxisch einzustufen^[160], wohingegen mit steigendem DS dies für **17c** nur noch bis 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gilt und **17d** fast im gesamten Konzentrationsbereich ($c > 7,81 \mu\text{g}/\text{mL}$) als toxisch eingestuft werden muß.

Entsprechend dem *charge dilemma* zeigen die zelltoxischen Polymere aufgrund ihrer höheren DS und daraus resultierend der höheren Ladungsdichten am Polymer auch höhere Transfektionseffizienzen. Polymer **17b** hat mit einem DS von 0,40 auch bei hohen N/P-Verhältnissen von 40 eine zu vernachlässigende Transfektionseffizienz. Steigt die Ladungsdichte infolge der höheren DS-Werte, steigt auch die Transfektion. Dabei sind für N/P-Verhältnisse von 10 und 20 auch bei den Polymeren **17c** und **17d** die Transfektionseffizienzen sehr gering. Diese steigen jedoch auf $7738 \pm 3018 \text{ RLU}/\mu\text{g Protein}$ (**17c**) bzw. $28053 \pm 12959 \text{ RLU}/\mu\text{g Protein}$ (**17d**), wenn das N/P-Verhältnis auf 40 erhöht wird. Damit werden 4,8 % bzw. 17,4 % der Transfektionseffizienz der Positivprobe 2500 g/mol LPEI ($161649 \pm 95897 \text{ RLU}/\mu\text{g Protein}$, N/P=20) erreicht. In Abbildung 3.39 sind die Ergebnisse graphisch zusammengefaßt.

Die Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methyl]- β -Alaninester zeigen im Vergleich zu den Dextran- β -Alaninestern bereits bei geringeren DS-Werten vergleichbare Eigenschaften. Sie binden sehr gut DNS, erreichen jedoch auch schon bei ungefähr halb so hohen DS-Werten die Toxizitätsgrenze und transfizieren im Vergleich zu LPEI aber auch ähnlich gut. Sie sind damit ein weiteres Beispiel für das *charge dilemma*. Ihre vergleichsweise hohen pK_a -Werte sorgen für vollständige Protonierung bei physiologischen pH-Werten und daher auch für eine höhere Ladungsdichte als bei den Dextran- β -Alaninestern.

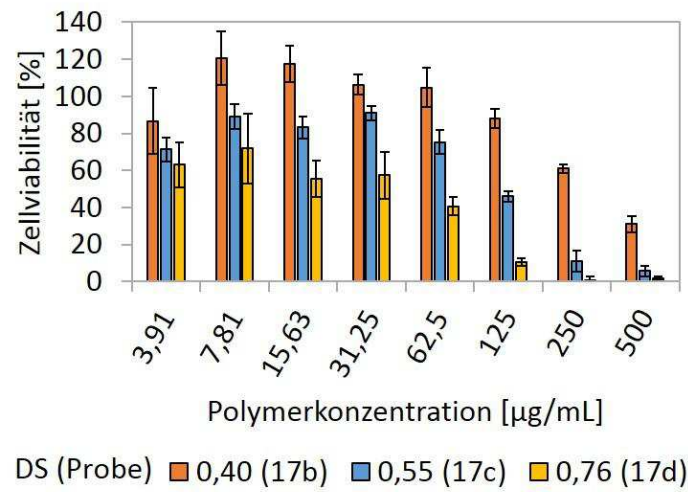


Abbildung 3.38: Zellviabilität der Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester bei verschiedenen Konzentrationen

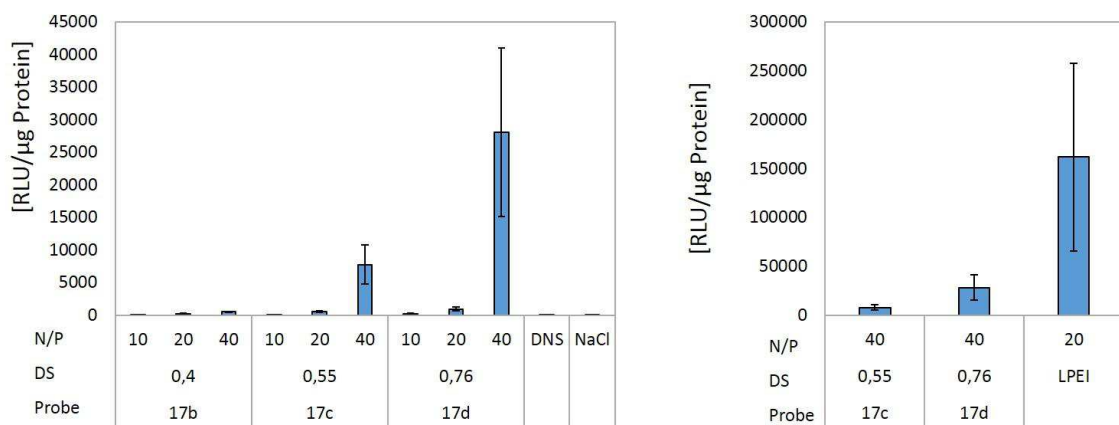


Abbildung 3.39: Transfektionseffizienz der Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester bei verschiedenen N/P-Verhältnissen

4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese von neuen polykationischen Verbindungen aus dem wichtigen Biopolymer Dextran und Aminosäuren, um Produkte mit protonierbaren Aminogruppen zu generieren. Die Bindung der Aminosäuren sollte über die Carboxylfunktion erfolgen. Die erhaltenen Polymere sollten strukturell eindeutig definiert sein, um so Struktur-Eigenschaftsbeziehungen bezüglich ihrer Eignung als nicht-virale Vektoren im Gentransfer ableiten zu können. Diese neuen Vektoren sollten aufgrund des natürlichen, nicht-synthetischen und daher biokompatiblen Charakters der Ausgangsstoffe in der Lage sein, den mit dem Begriff *charge dilemma* umschriebenen Sachverhalt, der von höherer Toxizität bei höherer Transfektionseffizienz eines Vektors ausgeht, im Sinne niedrigerer Toxizität bei hoher Transfektionseffizienz aufzulösen.

Dazu wurden einerseits Reaktionen mit Boc-geschützten Aminosäuren und den Aktivierungsreagenzien Iminiumchlorid und CDI in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Andererseits wurden Umsetzungen von ungeschützten Aminosäuren unter gleichen Bedingungen studiert.

Die Synthesen unter Verwendung der Boc-geschützten Aminosäuren Glycin, β -Alanin und L-Lysin führten in zwei Schritten zu Dextran-Aminosäureestern. Zunächst wurden zwei für Carbonsäuren bereits etablierte Aktivierungsreagenzien, Iminiumchlorid und CDI, auf ihre Eignung als Veresterungsreagenz für Boc-geschützte Aminosäuren untersucht. Es zeigte sich, daß die erhöhte Elektrophilie am Carbonylkohlenstoff der Boc-geschützten α -Aminosäure L-Lysin infolge der Aktivierung mit Iminiumchlorid nicht für die Veresterungsreaktion ausreichte. Beim β -Alanin ist dieser Effekt aufgrund der größeren Entfernung der elektronenreichen Carbamatgruppe von der Carboxylgruppe und der resultierenden Schwächung der elektronischen Konjugation geringer ausgeprägt. Für eine effiziente Veresterung eignet sich Iminiumchlorid aber nicht. Die Veresterung mit CDI hingegen war erfolgreich und es wurden Produkte mit DS-Werten von maximal 1,9 bei der Verwendung von Boc-Glycin und Boc- β -Alanin erhalten. Darüber hinaus konnten unter Verwendung von Boc₂-L-Lysin in DMSO neuartige Dextranderivate mit DS-Werten von maximal 1,4 hergestellt werden. Es wurde erstmalig für Reaktionen mit

Dextran geschmolzenes Imidazol als Lösungsmittel für Veresterungsreaktionen genutzt, was zu DS-Werten von 1,4 bei Verwendung von Boc- β -Alanin und 1,0 bei Verwendung von Boc₂-L-Lysin führte.

Die erhaltenen Produkte wurden mittels NMR- und FTIR-Spektroskopie und Größenausschlußchromatographie untersucht. Dabei zeigten sich Einflüsse des Lösungsmittels auf die Molmasse und Reinheit der Produkte.

Nachfolgend wurde die Schutzgruppe im sauren Milieu unter Verwendung verschiedener Säure-Lösungsmittelsysteme abgespalten. Durch den geringsten Verlust an Funktionalität ist 10 %-ige Schwefelsäure in 1,4-Dioxan das beste Entschützungsreagenz. Die so erhaltenen Produkte wurden mit Hilfe von FTIR- und NMR-Spektroskopie, Elementaranalyse und AF4 charakterisiert.

Die erhaltenen Dextran-Aminosäureester wurden mit potentiometrischer Titration und Polyelektrolyttitration charakterisiert. Dabei wurden ihre pK_a -Werte ermittelt. Diese stimmen mit denen der entsprechenden Methylester überein. Die Stabilität im alkalischen Milieu ist für die Dextran- β -Alaninester am höchsten. Sie zersetzen sich erst ab pH-Werten oberhalb von 8 und sind bei Lagerung bei basischen pH-Werten ebenfalls stabiler als die Ester von Glycin, L-Ornithin und L-Lysin.

Die Dextran-Aminosäureester weisen in Abhängigkeit von der verwendeten Aminosäure unterschiedliche Eigenschaften auf. Die Dextran-Glycinester sind aufgrund des niedrigen pK_a -Wertes der α -Aminogruppen nicht in der Lage, bei pH=7,4 DNS zu binden und Komplexe zu formen. Die Ester der anderen α -Aminosäure L-Lysin binden aufgrund des Vorliegens der ϵ -Aminogruppe ebenso wie die β -Alaninester DNS. Für die Dextran- β -Alaninester war ein DS-Wert von 1,5 besonders wichtig. Proben ab diesem DS-Wert zeigten hohe Transfektionseffizienzen bei gleichzeitigem Schutz vor Abbau der DNS durch DNase I, niedrige Hämolyseeigenschaften, nur leichte Hämooaggregation und hohe Zellviabilitäten bis 31,3 $\mu\text{g/mL}$. Die Dextran-L-Lysinester zeigten günstigere Eigenschaften bezüglich Toxizität und Schutz vor enzymatischem Abbau, jedoch trat nur minimale Transfektion auf.

Beim Vorliegen beider Aminosäuren in einem Polymer zeigte sich, daß die Transfektionseigenschaften durch den Gehalt von β -Alanin bestimmt werden, die Toxizität durch L-Lysin herabgesetzt wird und der Schutz vor enzymatischem Abbau der DNS erhöht werden konnte im Vergleich zu Dextran- β -Alaninestern gleicher DS-Werte. Die Kombination von zwei Aminosäuren in einem Polymer hat sich zur Verbesserung der Eigenschaften im Vergleich zu den Homoestern als vorteilhafte Strategie für neue Vektoren für den Gentransfer erwiesen.

Das Durchführen der Reaktionen mit ungeschützten Aminosäuren unter den Bedingungen der Veresterungsreaktionen führte in Abhängigkeit von Aktivierungsreagenz und Aminosäure zu unterschiedlichen Ergebnissen. L-Lysin reagierte mit CDI zu Polymeren, die aus verzweigten *oligo*-Peptiden bestanden, die die Dextranketten miteinander vernetzten. Aufgrund ihrer Unlöslichkeit eigneten sich diese Produkte nicht für weitere Untersuchungen. Die Reaktion von β -Alanin und Iminiumchlorid führte zu eindeutig definierten polymeren Produkten, bei denen eine β -Alanin-Einheit zum Ester mit dem Dextran reagierte und zum Formamidin mit dem Iminiumchlorid. Die Struktur der Produkte wurde eindeutig mittels NMR-Spektroskopie, FTIR-Spektroskopie und Elementaranalyse bestätigt. Die erhaltenen Dextran-*N*-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester zeigen bereits bei DS-Werten von 0,76 vergleichbare Transfektionswerte wie Dextran- β -Alaninester mit DS=1,68. Der Grund dafür sind die guten Komplexbildungseigenschaften.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien

Dextran von *Leuconostoc mesenteroides* mit $M_r=60000$ g/mol sowie Dextran von *Leuconostoc* spp. mit $M_r=6000$ g/mol wurden über Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Alle weiteren Chemikalien wurden ebenfalls über Sigma-Aldrich erworben. Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Deuterierte NMR-Lösungsmittel wurden erworben über Euriso-Top (Saint Aubin Cedex, Frankreich).

5.2 Messungen

NMR-Spektroskopie NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 250 MHz und einem Bruker Avance 400 MHz mit 16 Scans für ^1H -NMR-Spektren und bis zu 200000 Scans für ^{13}C -NMR-Spektren bei Raumtemperatur erhalten. Die Probenmenge betrug ca. 200 mg/mL bei 0,5 mL Probenvolumen.

FTIR-Spektroskopie FTIR-Spektren wurden mit KBr-Presslingen und einem Nicolet AVATAR 370 DTGS Spektrometer aufgenommen.

Elementaranalyse EA wurden mit einem CHNS 932 Analyzer (Leco, Deutschland) oder einem Vario ELIII (Elementaranalysensysteme, Hanau, Deutschland) durchgeführt und der Halogengehalt wurde nach Schöniger^[180] bestimmt.

Asymmetrische-Fluß-Feldflußfraktionierung AF4 wurde gemessen mit einem AF2000 MT System (Postnova Analytics, Landsberg, Deutschland), an dem ein UV-Detektor (PN3211, 260 nm), ein RI-Detektor (PN3150) und ein *Multiangle light scattering* (MALLS)-Detektor (PN3070, 633 nm) angeschlossen sind. Der Eluent wird mit Hilfe dreier Pumpen (*tip*, *focus*, *cross-flow*) gepumpt und die Probe mit einem Autosampler (PN5300) in den Kanal injiziert. Der Kanal ist trapezförmig mit einer Gesamtfläche von 31,6 cm². Die

Nennhöhe des *spacer* ist 500 μm und eine Membran aus regenerierter Cellulose mit einer molaren Masse von 10 kg/mol wurde als Akkumulierungswand genutzt. Die Experimente wurden bei 25°C durchgeführt, der Eluent bestand aus 25 mM Acetatpuffer mit 20 mM NaCl-Lösung. Die Detektorflußrate wurde auf 0,5 mL/min für alle Proben eingestellt und 20 μL (5 mg/mL) wurden injiziert mit einer Flußrate von 0,2 mL/min für 7 Minuten. Der *cross flow* wurde auf 1,50 mL/min eingestellt und sank exponentiell auf 0 innerhalb von 18 Minuten. Nachdem der *cross flow* 0 erreicht hatte, wurde er für alle Proben bei 0 gehalten für mindestens 20 Minuten, um die vollständige Eluierung zu gewährleisten. Zur Berechnung der molaren Masse wurde ein Zimm-Plot genutzt. Das Brechungsindexinkrement (dn/dc) wurde von allen Proben durch manuelle Injektion direkt in den Kanal ohne Fokussierung oder *cross flow* bei bekannter Konzentration gemessen. Das Brechungsindexinkrement wurde als Durchschnittswert dreier Injektionen aus der Fläche unter der Brechungsindexdetektor(RI)-Kurve berechnet.

Größenausschlußchromatographie (SEC) SEC wurde durchgeführt an einem Jasco SEC System (SEC-Pumpe: PU-980; Brechungsindexdetektor RI-2031 Plus; UV-Detektor UV-975; Säulen: PSS NOVEMA pre/3 000 Å/300 Å in Serie; Flußrate: 0,5 mL/min; 65°C). Als Eluent wurde DMSO/LiBr verwendet, als Standard diente Pullulan.

Potentiometrische Titration Die Lösungen wurden mit „ultrapurem“ Wasser hergestellt, das durch Abkochen von deionisiertem Wasser und Entgasen mit Stickstoff unter Stickstoffatmosphäre erhalten wurde. Der Carbonatgehalt der Lösungen ist somit sehr gering. Die Ionenstärke wurde mit KCl-Lösung auf 0,1 M eingestellt. Ein Titrierautomat mit zwei Büretten (Mettler Toledo DG 117) wurde mit wässrigen Lösungen von 0,1 M HCl und 0,1 M KOH gefüllt und für die Messungen genutzt. Bei der potentiometrischen Titration wurden ca. 20 mg einer Probe in 10 mL Wasser gelöst. Die Proben wurden je zweimal zwischen $3,0 \leq \text{pH} \leq 11,5$ vorwärts (*hin*, steigender pH) und rückwärts (*her*, sinkender pH) titriert, nachdem der Start-pH-Wert mit 0,5 mL 0,1 M Salzsäure eingestellt worden war. Der Titrant wurde in Volumina zwischen 0,001-0,25 mL zugegeben. Das Stabilitätskriterium nach jeder erfolgten Zugabe wurde eingestellt auf $dE/dt=0,1$ mV/50 s und 50 s wurden als Minimalzeit gewählt, um das Gleichgewicht zwischen der Zugabe von zwei Portionen Titrant zu erreichen. Als Blindwert wurde unter den gleichen Bedingungen eine Lösung ohne Probe titriert. Das Titrantvolumen wurde normalisiert zur Masse der titrierten Proben und als Ladung je Gewicht (mmol/g) gegen die pH-Kurve ausgedrückt. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur ausgeführt.

Die Ladungsisothermen wurden, wie bereits in der Literatur^[152,181] diskutiert, aus den Titrationskurven berechnet und stellen die Ladung als eine Stoffmenge in mmol von geladenen Gruppen als Funktion des pH-Werts dar.

Polyelektrolyttitration Die Lösungen wurden für das Standardexperiment in einer Konzentration von 2 mg/mL bei verschiedenen pH-Werten hergestellt. Die pH-Werte waren pH=3,0; 7,4; 8,4 und 10,0. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HCl und 0,1 M NaOH eingestellt. Für eine Messung wurden 0,5 mL der einfach geladenen Dextran-Aminosäureester (DGE, DAE) bzw. 0,25 mL der zweifach geladenen Dextran-Aminosäureester (DOE, DLE) zu 40 mL Wasser eines bestimmten pH-Wertes zugegeben. Als Indikator diente Toluidin-Blau ($c=0,0001$ mol/L) in wässriger Lösung, von dem 1,5 mL (pH=3,0) bzw. 1,0 mL (pH=7,4; 8,5; 10) zugegeben wurden. Als Titrant wurde eine Lösung in Wasser des Natriumsalzes der Polyvinylsulfonsäure mit einer Konzentration von $c=0,001$ mol/L verwendet. Die Titration wurde mit einem Mettler Toledo DL 53 Titrator durchgeführt unter Zugabe von je 0,1 mL PVS. Die Absorbanz wurde als Potentialänderung in mV mit einem Mettler Toledo Phototrode DP 660 bei 660 nm gemessen. Zur Bestimmung der Stoffmenge der am Polymer gebundenen protonierten Aminogruppen wurde die Absorbanz gegen das zugegebene Volumen an PVS aufgetragen. Das Volumen an PVS wurde bestimmt als der Punkt, an dem $\lambda E/\text{mV} > 2$ für $\lambda V = 0,1$ mL gilt.

Polyplexbildung Als Plasmid-DNS wurde ein Luciferase-Reportergen (pGL3 Control vector, Promega, Madison, USA) genutzt. Das Plasmid wurde auf *E. coli* TG1 (ATCC-11775, Hans-Knöll-Institut, Jena, Deutschland) übertragen und dupliziert. Die Isolierung erfolgte unter Verwendung eines E.Z.N.A. Plasmid Maxi Kit nach den Anweisungen des Herstellers. Das Mischverhältnis von Polymer zu pGL3 wurde berechnet als N/P-Verhältnis, wobei N der Stickstoff des Polymers und P der Phosphor der Phosphatgruppen der DNS sind. Die Komplexe wurden der Literatur folgend hergestellt.^[154] Dabei wurden Polymer und DNS separat in 150 mM NaCl-Lösung bei pH=7,4 oder, je nach Experiment, in hochreinem Wasser gelöst. Anschließend wurden sie gemischt mit einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 25 °C.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay Die *in vitro*-Zytotoxizität der Polymere wurde mit Hilfe eines MTT-Assays nach Mosmann^[182] und Bauer *et al.*^[183] an L929 Mausfibroblasten (ACC-2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland) getestet. Dabei wur-

den die Zellen 24 h nach dem Aussäen und Entfernen des Mediums (Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium, RPMI 1640, PAA, Pasching, Österreich) für 24 h mit 100 μL Polymerlösung mit Konzentrationen von 3,9-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ behandelt. Thiomersal (Caelo, Hilden, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,02 % wurde als Positivkontrolle verwendet. Reines Zellkulturmedium wurde als Negativkontrolle verwendet. Zellkulturmedium ohne Zellen wurde als Blindprobe genutzt. Für die Zellviabilitätsuntersuchungen wurden die Zellen mit 200 μL 0,5 mg/mL MTT-Lösung (Sigma-Aldrich) im Medium für 4 h behandelt und anschließend mit 200 μL DMSO lysiert. Absorbanzmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 570 nm bei 25 °C unter Verwendung eines Plattenlesegeräts (Fluostar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland). Die Experimente erfolgten mit $n=7$ und einer Wiederholung. Die Ergebnisse wurden prozentual zur Negativkontrolle nach Subtraktion der Blindprobe von allen Werten ausgerechnet nach:

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Blindprobe}}}{\text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Blindprobe}}} \cdot 100 \%$$

Nach DIN EN ISO 10993-5^[160] wurden Polymere mit einer Zellviabilität ≤ 70 % als toxisch eingestuft.

Hämolyse Die Lyse roter Blutzellen wurde nach Bauer *et al.*^[183] durchgeführt. Dabei wurden 200 μL Polymerlösung zu 200 μL Erythrozytenlösungen pipettiert, deren Konzentration auf 1,8 Mrd. Zellen/ μL eingestellt wurde. Die Konzentrationen der Polymerlösungen bewegten sich im Bereich 0,24-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C auf 96-Well-Deepwellplatten (Masterblock 96-Well, Greiner, Bio One) auf einem Rüttler (Titramax X100, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) bei 450 Umdrehungen/min für eine Stunde. Die Positivkontrolle bestand aus 200 μL 1 % Triton-X 100 Lösung (Ferak, Berlin, Deutschland) in deionisiertem Wasser mit 200 μL Zellsuspension ($n=3$). Als Negativkontrolle wurden 200 μL Phosphatpuffer (PBS) mit 200 μL Zellsuspension ($n=12$) und zur Messung der Eigenabsorption (Blindprobe) 400 μL PBS verwendet ($n=8$). Die Hämolyse wurde nach

$$\text{Hämolyse [\%]} = \frac{(\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Blindprobe}}) - (\text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Blindprobe}})}{\text{Absorption}_{\text{Positivkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Blindprobe}}} \cdot 100 \%$$

berechnet. Nach ASTM F756-08^[184] wurden Hämolysewerte < 2 % als nicht hämolytisch, 2-5 % als leicht hämolytisch und > 5 % als hämolytisch eingestuft.

Erythrozytenaggregation Erythrozytenaggregation wurde der Literatur folgend getestet.^[183,185,186] Dabei wurden 20 Mio. Erythrozyten/mL mit Polymerlösungen verschiedener Konzentrationen im Bereich 0,024-50 $\mu\text{g/mL}$ behandelt. 25000 g/mol BPEI (30 $\mu\text{g/mL}$) und PBS wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle genutzt. Reines PBS wurde als Blindprobe genutzt. Die Platten wurden für 2 h bei 37 °C auf einem Rüttler (Titramax X100) bei 1350 Umdrehungen/min inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit einem Plattenlesegerät (Fluostar OPTIMA) bei 645 nm vermessen. Die Werte werden angegeben als $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ nach:

$$\Delta\text{Abs}_{\text{max}} =$$

$$(\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Blindprobe}}) - (\text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Blindprobe}})$$

zur Quantifizierung der Aggregation. Zusätzlich wurde die Aggregation visuell untersucht (Mikroskop Primo Vert, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland; mit Kamera AxiCamErc5s, Carl Zeiss). Es wurde ein 3-Stufensystem zur Einordnung der Aggregation nach visueller Begutachtung angewandt: 1 = keine Aggregation, 2 = leichte Aggregation, Bildung „münzrollenartiger“ Strukturen, aber ein Großteil der Erythrozyten liegt frei im Medium vor, 3 = starke Aggregation, ein Großteil der Erythrozyten liegt als Cluster vor.

Hydrodynamischer Durchmesser und Zetapotential Hydrodynamischer Durchmesser und Zetapotential wurden mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) vermessen. Die Komplexe wurden bei N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 wie oben beschrieben hergestellt. Der hydrodynamische Durchmesser wurde mit dynamischer Lichtstreuung mit Licht einer Wellenlänge von 633 nm, einem Einstreuwinkel von 173° und 25 °C für 240 s gemessen. Die Messung wurde sechsmal wiederholt. Das Zetapotential wurde mit Hilfe auf 600 μL verdünnter Komplexlösungen in einer Zetasizerküvette (Malvern Instruments) dreimal bei 25 °C gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Zetasizer Software 7.11 zur Ermittlung der Mittelwerte.

DNS-Bindekapazität Komplexe mit N/P-Verhältnissen von 0,5-40 wurden hergestellt unter Verwendung von 2 μg pGL3 in 50 μL 150 mM NaCl-Lösung mit pH=7,4. Polymer ohne DNS wurde als Kontrolle für unspezifische Wechselwirkungen genutzt. Freies pGL3 wurde ebenfalls als Kontrolle eingesetzt. Der Assay folgte der Literatur.^[187] Zusätzlich wurde ein ACCU BLUE-Assay (ACCUBlue High sensitivity dsDNA Quantitation Kit with 8 DNA Standards, Biotium, Hayward, USA) zur semi-quantitativen Detektion ungebundener DNS durchgeführt. 5 μL Testlösung wurden jeweils verwendet. pGL3 ohne Polymer wurde als 100 %-Referenz genutzt. Als Blindprobe diente 150 mM NaCl-

Lösung mit pH=7,4. Die Lösungen wurden in schwarzen Polystyrenplatten (Fluotrac 200, Greiner Bio-One) mit 200 μ L einer 100X-Verstärker- und Quantifizierungslösung (1:1000) gemischt und inkubiert für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Fluoreszenz unter Verwendung eines Plattenlesegerätes (Fluostar OPTIMA) bei 485 nm Anregung/530 nm Emission gemessen. Die Ergebnisse wurden in [%] der reinen Plasmidreferenz nach Subtraktion der Blindprobe errechnet.

Komplexstabilität gegenüber enzymatischem Abbau Komplexe der Polymere wurden bei N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 wie bereits beschrieben^[187] gemessen. Dazu wurden die Komplexlösungen (50 μ L, 1 μ g Plasmid-DNS) mit 5 μ L Pufferlösung (pH=7,4) gemischt und auf mit Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG) beladenes 1%-iges Agarosegel (peqGold Universal Agarose, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) aufgetragen. Freie DNS und freie Polymerlösungen wurden als Kontrollproben genutzt, Bromphenolblau als Laufkontrolle. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 80 V im Verlauf einer Stunde in einer Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit Laufpuffer TAE. Die Gele wurden dokumentiert unter UV-Transillumination (Intas GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 312 nm mit einem Geldokumentierungssystem (Digit Store UNO, Intas GmbH). Zur Bestimmung der Stabilität gegen enzymatischen Abbau wurden die Komplexe mit DNase I (5 Kunitz/ μ g Plasmid, Amersham Biosciences, Amersham, UK) behandelt. Die DNase I wurde vorher mit 150 mM NaCl-Lösung, die mit 20 mM MgCl₂ versetzt wurde, bei pH=7,4 und 37 °C für 45 min behandelt. Nach der Deaktivierung des Enzyms durch Erhitzen (70 °C, 35 min) und Freisetzen der Plasmid-DNS aus den Komplexen durch Dextran-Sulfat-Behandlung (10 mg/mL für 20 min bei 37 °C, 500000 g/mol, Sigma-Aldrich), wurden die Präparate per Gelelektrophorese untersucht. Unbehandelte freie Plasmid-DNS und freie Plasmid-DNS, die wie die Komplexe behandelt worden war ohne den Zusatz von DNase I, dienten als Negativkontrolle. Nicht komplexierte Plasmid-DNS, die mit DNase I behandelt worden war, diente als Positivkontrolle.

Transfektionseffizienz Die Transfektionseffizienz wurde an CHO-K1-Zellen (500000 Zellen/Well in 12 Wellplatten, ACC-110, DSMZ) getestet. Diese wurden bei 37 °C, bei 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert in Hams F12-Medium, supplementiert mit 1 mM L-Glutamin und 10 % fötalem bovinem Serum (FBS) Gold. Die Komplexe wurden frisch hergestellt (4 μ g pGL3-Plasmid in 200 μ L 150 mM NaCl-Lösung). Nach 24 h wurde das Medium ersetzt durch Testproben in Serum-haltigem

Medium. Mit komplexfreier 200 μL physiologischer Natriumchloridlösung behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Komplexe aus kommerziellem LPEI (2500 g/mol, Polysciences, Warrington, USA) mit N/P=20 und Plasmid-DNS dienten als Kontrollen. Nicht komplexierte DNS diente als Negativkontrolle. Nach der Inkubation von 4 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden vor der Lyse für weitere 44 h inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde bestimmt unter Verwendung eines Luciferase-Assays im Mikroplattenlesegerät (Fluostar OPTIMA) und errechnet als relative Helligkeit (*relative light units* (RLU)/ μg Protein). Der Proteingehalt der Proben wurde mit einem Bicinchoninsäureassay (BCA) bestimmt. 25 μL Zellysatz wurden mit 10 μL 0,05 M Iodacetamidlösung bei 37°C für 20 min behandelt, um Dithiothreitol des Lysisreagenz zu deaktivieren. Die Absorption wurde bestimmt mit Hilfe eines Mikroplattenlesegeräts bei 570 nm und verglichen mit der Bovines-Serum-Albumin-(BSA)-Standardkurve.

5.3 Synthesen

5.3.1 $\text{N}_\alpha, \text{N}_\epsilon$ -di-tert-Butoxycarbonyl-L-Lysin^[1]

Zu einer Lösung von 50,8 g (0,28 mol) L-Lysinhydrochlorid in 600 mL eines Wasser/2-Propanolgemisches (1:1) werden unter Rühren 24,38 g (0,61 mol) Natriumhydroxid (NaOH) in 100 mL Wasser zugegeben. Nachdem sich alles gelöst hat, werden 127,0 g (0,58 mol) di-tert-Butyldicarbonat (Boc_2O) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 2-Propanol mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der pH-Wert der Lösung wird auf pH=1 mit Salzsäure eingestellt, so daß das Produkt ausfällt. Die wässrige Lösung wird dreimal mit je 200 mL Ethylacetat extrahiert und anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit zweimal 200 mL Wasser und zweimal 200 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die Lösung wird über Magnesiumsulfat (MgSO_4) getrocknet. Nach Filtration wird das Wasser am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält 78,5 g (0,23 mol, 82,1 %) des Produktes als ölige Substanz.

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆*)[ppm]: δ = 174,6 (COOH); 156,0 ($\text{N}_{\alpha/\epsilon}\text{H-C=O}$); 78,3 ($\text{O-C}_\alpha(\text{CH}_3)_3$); 77,7 ($\text{O-C}_\epsilon(\text{CH}_3)_3$); 53,8 (C_α); 30,8 (C_β); 28,7 ($\text{C}_\alpha\text{H}_3$); 28,6 ($\text{C}_\epsilon\text{H}_3$); 23,3 (C_δ); 22,4 (C_γ)

*¹³C-NMR-Signal von C_ϵ liegt unter dem Signal von DMSO-d₆

5.3.2 Synthese von Dextran-Boc_n-Aminosäureestern (1-3)

Synthese in CDI/DMSO (1a-d, 2a-d, 3a-d) In einem typischen Beispiel werden zu 6,53 g (37,2 mmol) Boc-geschütztem Glycin in 200 mL DMSO 6,86 g (40,3 mmol) CDI zugegeben. Nach 60 Minuten ist die Gasentwicklung beendet und 6,00 g (37,0 mmol) Dextran werden zur Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktion läuft für 16 h bei 80 °C. Das Produkt wird danach durch Ausfällen in 400 mL Eiswasser gewonnen, filtriert und getrocknet.

Synthese in CDI/Imidazol (4a-d, 5a-d) In einem typischen Beispiel werden 9,10 g Imidazol bei 120 °C unter ständigem Rühren mit einem KPG-Rührer geschmolzen. Nach Zugabe von 3,52 g (18,6 mmol) Boc-β-Alanin und 3,13 g (19,3 mmol) CDI läßt man eine Stunde rühren. Nach Zugabe von 1,01 g (6,2 mmol) Dextran wird die Temperatur auf 100 °C gesenkt und 1,5 h gerührt. Es werden 150 mL Wasser zum Ausfällen zugegeben, das Produkt filtriert, mit Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Synthese in LiCl/DMAc mit DMF/Oxalylchlorid (7a-d) In einem typischen Beispiel werden 1,01 g (6,2 mmol) Dextran zusammen mit 1,05 g LiCl vorgelegt. Es werden 40 mL DMAc zugegeben und bei 120 °C gerührt. Nach 1 h ergibt sich eine klare Lösung und die Temperatur wird auf 60 °C abgesenkt. In einem anderen Kolben werden 30 mL DMF auf -20 °C gekühlt und gerührt. Dann werden 1,6 mL (18,4 mmol) Oxalylchlorid zugetropft, wobei darauf geachtet wird, daß die Temperatur -20 °C nicht überschreitet. Es bildet sich ein weißer Niederschlag. Nachdem die Gasentwicklung beendet ist, werden 3,5 g (18,2 mmol) Boc-β-Alanin zugegeben und 2 h gerührt, wobei sich der Niederschlag wieder auflöst und die Lösung eine gelbliche Färbung annimmt. Die Temperatur wird dabei nicht mehr kontrolliert, so daß sich das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen kann. Die Lösung wird zur Dextranlösung zugetropft und für 16 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wird das Produkt in 300 mL Ethylacetat ausgefällt, filtriert und in 50 mL Wasser gelöst. Anschließend wird dialysiert und gefriergetrocknet.

Dextran-Boc-Glycinester (1b): ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃)[ppm]: δ = 3,0 – 5,5 (7H, AGU, CH_α); 1,34 (9H, CH₃)

¹³C-NMR (250 MHz, CDCl₃)[ppm]: δ = 170,9 (C=O); 156,7 (NH-CO); 99,6 (C1); 78,6 (O-C(CH₃)); 74,0 (C3); 72,3 (C2); 70,8 (C4); 69,6 (C5); 65,9 (C6); 42,0 (CH_α); 28,9 (CH₃)

Dextran-Boc- β -Alaninester (2b): $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)[ppm]: $\delta = 3,0 - 5,5$ (6H, AGU); 3,10 (2H, H_β), 2,31 (2H, H_α); 1,34 (9H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)[ppm]: $\delta = 171,5$ (C=O); 156,1 (NH-CO); 99,0 (C1); 78,5 ($\text{O-C}(\text{CH}_3)$); 73,0 (C3); 71,3 (C2); 70,8 (C4); 68,5 (C5); 65,8 (C6); 36,2 (C_β); 34,4 (C_α); 29,4 (CH_3)

Dextran-Boc₂-L-Lysinester (3c): $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)[ppm]: $\delta = 3,0 - 5,5$ (7H, AGU, H_α); 3,06 (2H, H_ϵ); 2,00 – 1,00 (26H, $\text{H}_{\beta-\delta}$, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)[ppm]: $\delta = 171,6$ (C=O); 156,2 (NH-CO); 96,2 (C1); 79,6 ($\text{O-C}_\alpha(\text{CH}_3)$); 77,0 ($\text{O-C}_\epsilon(\text{CH}_3)$); 74,4 (C3); 71,0 (C2); 69,0 (C4); 68,0 (C5); 65,7 (C6); 53,3 (C_α); 40,1 (C_ϵ); 32,33 (C_β); 29,5 (C_δ); 22,4 (C_γ)

5.3.3 Peracetylierung/-propionylierung, allgemeine Vorschrift

Zu ca. 0,3 g des Dextran-Boc_n-Aminosäureesters werden 6 mL Pyridin und 6 mL des gewünschten Anhydrids (Essigsäureanhydrid, Propionsäureanhydrid) zugegeben. Nach der weiteren Zugabe einer Spatelspitze 4-(Dimethylamino)-pyridin wird das Reaktionsgemisch für 24 h bei 80 °C gerührt. Das Produkt wird in Wasser ausgefällt, filtriert, in 3 mL Chloroform gelöst, abermals in Wasser ausgefällt und getrocknet.

FTIR (KBr): keine Bande für ν_{OH}

5.3.4 Entschützen der Dextran-Boc_n-Aminosäureester zu Dextran-Aminosäureestern (6, 8-14)

Entschützen mit Chlorwasserstoff (8.1a-c/9.1a-c/10.1a-d) In einem typischen Beispiel werden 15 g Dextran-Boc_n-Aminosäureester **1-3** in 60 mL 1,4-Dioxan gelöst. Chlorwasserstoff (HCl_g), der durch Betropfen von 50 g NaCl mit 50 mL Schwefelsäure gewonnen wird, wird in die Reaktionsmischung eingeleitet. Diese wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Produkt schon teilweise ausfällt. Das Produkt wird in 300 mL Diethylether ausgefällt, filtriert, mit Ethylacetat gewaschen, in 50 mL Wasser gelöst, dialysiert und gefriergetrocknet.

Entschützen mit Schwefelsäure (6a-c, 8.2a-c/9.2a-d/10.2a-d, 11a-g, 12a-f, 13a-d, 14a-e) In einem typischen Beispiel werden 15 g Dextran-Boc_n-Aminosäureester **1-3** in 60 mL 1,4-Dioxan gelöst. 6 mL Schwefelsäure werden dazugegeben. Danach wird die Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Produkt schon teilweise

ausfällt. Das Produkt wird in 300 mL Diethylether ausgefällt, filtriert, mit Ethylacetat gewaschen, in 50 mL Wasser gelöst, dialysiert und gefriergetrocknet.

Entschützen mit TFA (8.3a-c/9.3a-d/10.3a-d) In einem typischen Beispiel werden 15 g Dextran-Boc_n-Aminosäureester **1-3** in 50 mL Dichlormethan suspendiert. Nach Zugabe von 50 mL TFA wird die Mischung für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Produkt schon teilweise ausfällt. Das Produkt wird in 300 mL Diethylether ausgefällt, filtriert und in 50 mL Wasser gelöst. 25 g Ionenaustauscher Amberlite IRA-410 werden zugegeben und für 1 h gerührt, um das Hydrochlorid der Dextranaminosäureester zu erhalten. Nach Filtration wird dialysiert und gefriergetrocknet.

Dextran-Glycinester (8.2c) ¹H-NMR (250 MHz, D₂O) [ppm]: δ = 5,18 (1H, H_{2s}); 5,08 (1H, H_{1C_{2s}}); 4,90 (1H, H₁); 4,00-3,32 (8H, AGE H₂-H₆, C_αH₂)

¹³C-NMR (250 MHz, D₂O)[ppm]: δ = 168,03 (C=O); 97,64 (C₁); 95,19 (C_{1C_{2s}}); 77,61 (C_{2s}); 73,35 (C₃); 71,26 (C₂); 70,13 (C₄); 69,41 (C₅); 65,50 (C₆); 40,11 (C_α)

EA[%]: C 33,98; H 5,8; N 3,37; S 3,97; DS 1,49; DPr 1,44

Dextran-β-Alaninester (9.2c) ¹H-NMR (250 MHz, D₂O) [ppm]: δ = 5,29 (1H, H_{2s}); 5,13 (1H, H_{1C_{2s}}); 4,96 (1H, H₁); 4,3-3,36 (6H, AGE H₂-H₆); 3,25 (2H, H_β); 2,89 (2H, H_α)

¹³C-NMR (250 MHz, D₂O)[ppm]: δ = 171,96 (C=O); 97,54 (C₁); 95,16 (C_{1C_{2s}}); 76,18 (C_{2s}); 73,35 (C₃); 71,12 (C₂); 70,01 (C₄); 69,51 (C₅); 65,80 (C₆); 34,95 (C_β); 31,16 (C_α)

EA[%]: C 33,69; H 6,21; N 4,97; S 5,43; DS 0,99; DPr 0,94

Dextran-L-Lysinester (10.2c) ¹H-NMR (250 MHz, D₂O) [ppm]: δ = 5,15 (1H, H_{2s}); 5,07 (1H, H_{1C_{2s}}); 4,87 (1H, H₁); 4,39-3,32 (8H, AGU H₂-H₆, H_α); 2,94 (2H, H_ε); 1,95 (2H, H_δ); 1,66 (2H, H_β); 1,47 (2H, H_γ)

¹³C-NMR (250 MHz, D₂O)[ppm]: δ = 170,16 (C=O); 97,64 (C₁); 95,17 (C_{1C_{2s}}); 77,48 (C_{2s}); 73,37 (C₃); 71,36 (C₂); 70,11 (C₄); 69,36 (C₅); 65,27 (C₆); 52,8 (C_α); 39,98 (C_ε); 29,21 (C_β); 26,16 (C_δ); 21,26 (C_γ)

EA[%]: C 32,61; H 6,8; N 7,77; S 8,84; DS 1,20; DPr 1,20

5.3.5 Synthesen mit ungeschützten Aminosäuren

Dextran-(oligo-L-Lysin)-ester I (15a-d) In einem typischen Beispiel werden zu 7,22 g (50,0 mmol) L-Lysin in 150 mL DMSO 28,52 g (176,0 mmol) CDI zugegeben. Nach 60 Minuten ist die Gasentwicklung beendet und 2,02 g (12,3 mmol) Dextran werden zur Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktion läuft für 18 h bei 80°C. Das Produkt wird danach durch Ausfällen in 400 mL Ethylacetat gewonnen und filtriert. Der Filtrerrückstand wird in Wasser aufgeschlämmt, dialysiert und anschließend filtriert. Es ergeben sich zwei Produkte, der größere Teil ein in 2-Propanol, Wasser, Ethylacetat, Methanol, Diethylether, Aceton und DMSO unlöslicher Feststoff, der nach Trocknen des Filterkuchens erhalten wird (Produkt 1) sowie ein lösliches Produkt, das aus dem Filtrat nach Gefrier-trocknung erhalten wird (Produkt 2).

Produkt 1 (**15.2d**)

EA[%]: C 43,65; H 6,11; N 13,59; MS 2,02

Produkt 2 (**15.1d**)

EA[%]: C 49,16; H 6,37; N 19,59; MS 9,57

Dextran-(oligo-L-Lysin)-ester II (16a-d) In einem typischen Beispiel werden 37,07 g Imidazol bei 120°C bei ständigem Rühren mit einem KPG-Rührer geschmolzen. Nach Zugabe von 3,60 g (24,7 mmol) L-Lysin und 12,61 g (77,8 mmol) CDI läßt man eine Stunde rühren. Nach Zugabe von 1,00 g (6,2 mmol) Dextran wird die Temperatur auf 100°C gesenkt und 1 h gerührt. Es werden 180 mL 2-Propanol zum Ausfällen zugegeben und anschließend filtriert. Es ergeben sich zwei Produkte, der größere Teil ein in 2-Propanol, Wasser, Ethylacetat, Methanol, Diethylether, Aceton und DMSO unlöslicher Feststoff, der nach Trocknen des Filterkuchens erhalten wird (Produkt 1) sowie ein lösliches Produkt, das aus dem Filtrat nach Dialyse und anschließender Gefriertrocknung erhalten wird (Produkt 2).

Produkt 1 (**16.2d**)

¹H-NMR (250 MHz, 60°C, D₂O) [ppm]: δ = 4,97 (1H, H₁); 4,07-3,35 (7H, H₂-6, H _{α}); 3,06 (2H, H _{ϵ}); 1,83 (2H, H_{*beta*}); 1,70 (2H, H _{δ}); 1,37 (2H, H _{γ})

¹³C-NMR (250 MHz, 60°C, D₂O)[ppm]: δ = 182,9-176,3

(C=O_{Peptidester}); 162,7 (C=O_{Harnstoff, N _{ϵ}}); 162,0 (C=O'_{Harnstoff, N _{ϵ}}); 161,1 (C=O''_{Harnstoff}); 100,0 (C₁); 75,7 (C₃); 73,7 (C₂); 72,5 (C₄); 72,0 (C₅); 68,0 (C₆); 62,9 (C_{6'}); 57,0 (C _{α}); 41,4 (C _{ϵ}); 32,6 (C_{*beta*}); 28,7 (C _{δ}); 23,7 (C _{γ})

EA[%]: C 46,48; H 6,03; N 12,04; MS 1,52

Produkt 2 (**16.1d**)

EA[%]: C 45,22; H 6,32; N 10,55; MS 1,16

Dextran-N-[(Dimethylamino)-methylen]- β -Alaninester (17a-d) In einem typischen Beispiel werden 2,01 g (12,4 mmol) Dextran zusammen mit 2,06 g LiCl vorgelegt. Es werden 80 mL DMAc zugegeben und bei 120°C gerührt. Nach 1 h ergibt sich eine klare Lösung und die Temperatur wird auf 60°C abgesenkt. In einem anderen Kolben werden 60 mL DMF auf -20°C gekühlt und gerührt. Dann werden 6,4 mL (73,6 mmol) Oxalylchlorid zugetropft, wobei darauf geachtet wird, daß die Temperatur -20°C nicht überschreitet. Es bildet sich ein weißer Niederschlag. Nachdem die Gasentwicklung beendet ist, werden 3,29 g (37,0 mmol) β -Alanin zugegeben, wobei sich die Lösung klärt, eine gelbliche Färbung annimmt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Dextranlösung wird die Lösung zugetropft und weitere 16 h bei 60°C gerührt. Das Produkt wird in 500 mL Diethylether ausgefällt, filtriert und in 50 mL Wasser gelöst. Anschließend wird dialysiert und gefriergetrocknet.

¹H-NMR (250 MHz, 60°C, D₂O) [ppm]: δ = 8,14 (1H, N-CH=N); 5,49 (1H, H_{2s}); 5,45 (1H, H_{1C_{2s}}); 5,27 (1H, H₁); 4,40-3,65 (8H, H₂-H₆, H _{β}); 3,56 (3H, CH_{3,trans}); 3,34 (3H, CH_{3,cis}); 3,15 (2H, H _{α})

¹³C-NMR (250 MHz, 60°C, D₂O)[ppm]: δ = 172,4 (C=O); 157,4 (N-CH=N); 98,5 (C₁); 96,0 (C_{1C_{2s}}); 76,5 (C_{2s}); 73,9 (C₃); 71,9 (C₂); 70,6 (C₄); 70,2 (C₅); 68,0 (C_{3C_{2s}}); 66,2 (C₆); 63,6 (C_{6's}); 61,1 (C_{6'}); 43,6 (CH_{3,trans}); 42,7 (C _{β}); 36,2 (CH_{3,cis}); 34,9 (C _{α})

EA[%]: C 41,53; H 6,60; N 6,66; DS 0,55 (**17c**)

Literaturverzeichnis

- [1] Oskar Keller, Walter E. Keller, Gert van Look und Gernot Wersin. tert-Butoxycarbonylation of amino acids and their derivatives: N-tert-butoxycarbonyl-L-phenylalanine (L-phenylalanine, N-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-). *Organic Syntheses*, 63:160–170, 1985.
- [2] Florian Schlenk, Stefan Grund und Dagmar Fischer. Recent developments and perspectives on gene therapy using synthetic vectors. *Therapeutic Delivery*, 4(1):95–113, 2013.
- [3] Gene therapy clinical trials worldwide, 2015.
- [4] Dagmar Fischer und Alfred Fahr. Nichtvirale Gentransfer-Arzneimittel. Therapie mit synthetischen Vektoren. *Pharmazie in unserer Zeit*, 40(3):212–219, 2011.
- [5] Clement H. Bamford, Ian P. Middleton und Kadem G. Al-Lamee. Studies of the esterification of dextran: routes to bioactive polymers and graft copolymers. *Polymer*, 27(12):1981–1985, 1986.
- [6] Rihe Liu und Leslie E. Orgel. Polymerization of β -alanine-amino acids in aqueous solution. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 28(1):47–60, 1998.
- [7] Muhammad Ajaz Hussain, Tim Liebert und Thomas Heinze. First report on a new esterification method for cellulose. *Polymer News*, 29(1):14–16, 2004.
- [8] Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod und Maclyn McCarty. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *Journal of Experimental Medicine*, 79:137–158, 1944.
- [9] Barbara Langer und Klaus Cichutek. Klinische Anwendung der Gentherapie: Bisherige Erfahrungen und Zukunft. *Pharmazie in unserer Zeit*, 40(3):254–262, 2011.

- [10] Charles H. Jones, Chih-Kuang Chen, Anitha Ravikrishnan, Snehal Rane und Blaine A. Pfeifer. Overcoming nonviral gene delivery barriers: Perspective and future. *Molecular Pharmaceutics*, 10(11):4082–4098, 2013.
- [11] Lars Kaestner, Anke Scholz und Peter Lipp. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(6):1171–1176, 2015.
- [12] Hao Yin, Rosemary L. Kanasty, Ahmed A. Eltoukhy, Arturo J. Vegas, J. Robert Dorkin und Daniel G. Anderson. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15(8):541–555, 2014.
- [13] Kenji Kawabata, Yoshinobu Takakura und Mitsuru Hashida. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharmaceutical Research*, 12(6):825–830, 1995.
- [14] Afrouz Yousefi, Marianne Lauwers, Reka Nemes, Thijs van Holten, Negar Babae, Mark Roest, Gert Storm, Raymond Schiffelers und Enrico Mastrobattista. Hemocompatibility assessment of two siRNA nanocarrier formulations. *Pharmaceutical Research*, 31(11):3127–3135, 2014.
- [15] Bernardino Isaac Cerda-Cristerna, Hector Flores, Amaury Pozos-Guillen, Elias Perez, Chantal Sevrin und Christian Grandfils. Hemocompatibility assessment of poly(2-dimethylamino ethylmethacrylate) (PDMAEMA)-based polymers. *Journal of Controlled Release*, 153(3):269–277, 2011.
- [16] Ayman El-Sayed und Hideyoshi Harashima. Endocytosis of gene delivery vectors: From clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Molecular Therapy*, 21(6):1118–1130, 2013.
- [17] Clare E. Thomas, Anja Ehrhardt und Mark A. Kay. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5):346–358, 2003.
- [18] Mark A. Kay, Joseph C. Glorioso und Luigi Naldini. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7(1):33–40, 2001.
- [19] Thomas Winckler. Virale Gentransfer-Arzneimittel. Therapie mit “entschärften” Humanpathogenen. *Pharmazie in unserer Zeit*, 40(3):202–211, 2011.

- [20] Marina Cavazzana-Calvo, Salima Hacein-Bey, Genevieve De Saint Basile, Fabian Gross, Eric Yvon, Patrick Nusbaum, Franfoise Selz, Christophe Hue, Stephanie Certain, Jean-Laurent Casanova, Philippe Bousso, Franfoise Le Deist und Alain Fischer. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288(5466):669–672, 2000.
- [21] Peter Järver und Ülo Langel. The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discovery Today*, 9(9):395–402, 2004.
- [22] DeFu Zhi, ShuBiao Zhang, Bing Wang, YiNan Zhao, BaoLing Yang und ShiJun Yu. Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 21(4):563–577, 2010.
- [23] Vladimir Budker, Vladimir Trubetsky und Jon A. Wolff. Condensation of nonstoichiometric DNA/polycation complexes by divalent cations. *Biopolymers*, 83(6):646–657, 2006.
- [24] Victor A. Bloomfield. DNA condensation. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3):334–341, 1996.
- [25] David V. Schaffer, Nick A. Fidelman, Nily Dan und Douglas A. Lauffenburger. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5):598–606, 2000.
- [26] Zhuojun Dai, Torben Gjetting, Maria A. Matthebjerg, Chi Wu und Thomas L. Andresen. Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI . *Biomaterials*, 32(33):8626–8634, 2011.
- [27] Hu Yang, Stephanie T. Lopina, Linda P. DiPersio und Steven P. Schmidt. Stealth dendrimers for drug delivery: correlation between PEGylation, cytocompatibility und drug payload. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(5):1991–1997, 2008.
- [28] Corbin Clawson, Linh Ton, Santosh Aryal, Victoria Fu, Sadik Esener und Liangfang Zhang. Synthesis and characterization of lipid-polymer hybrid nanoparticles with pH-triggered poly(ethylene glycol) shedding. *Langmuir*, 27(17):10556–10561, 2011.

- [29] Wen-Chi Tseng und Chai-Min Jong. Improved stability of polycationic vector by dextran-grafted branched polyethylenimine. *Biomacromolecules*, 4(5):1277–1284, 2003.
- [30] Lichen Yin, Ziyuan Song, Kyung Hoon Kim, Nan Zheng, Haoyu Tang, Hua Lu, Nathan Gabrielson und Jianjun Cheng. Reconfiguring the architectures of cationic helical polypeptides to control non-viral gene delivery. *Biomaterials*, 34(9):2340–2349, 2013.
- [31] W. T. Godbey, K. K. Wu, G. J. Hirasaki und A. G. Mikos. Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, 26th:811–812, 1999.
- [32] Ilkka M. Helander, Hanna-Leena Alakomi, Kyösti Latva-Kala und Pertti Koski. Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 143(10):3193–3199, 1997.
- [33] Wenyu Li, Yajie Liu, Jianwei Du, Kefeng Ren und Youxiang Wang. Cell penetrating peptide-based polyplexes shelled with polysaccharide to improve stability and gene transfection. *Nanoscale*, 7(18):8476–8484, 2015.
- [34] Hui-zhen Jia, Xiao-hua Luo, Han Cheng, Juan Yang, Cao Li, Chen-Wei Liu, Jun Feng, Xian-zheng Zhang und Ren-xi Zhuo. Extraordinarily enhanced gene transfection and cellular uptake by aromatic hydrophobicization to PEI25K. *Journal of Materials Chemistry*, 22:24092–24101, 2012.
- [35] Fei Wang, Ke Hu und Yiyun Cheng. Structure-activity relationship of dendrimers engineered with twenty common amino acids in gene delivery. *Acta Biomaterialia*, 29:94–102, 2016.
- [36] Buddhadev Layek, Manas K. Haldar, Gitanjali Sharma, Lindsey Lipp, Sanku Mallik und Jagdish Singh. Hexanoic acid and polyethylene glycol double grafted amphiphilic chitosan for enhanced gene delivery: Influence of hydrophobic and hydrophilic substitution degree. *Molecular Pharmaceutics*, 11(3):982–994, 2014.
- [37] Jean Paul Behr. The proton sponge. A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia*, 51(1/2):34–36, 1997.

- [38] Yong Woo Cho, Jong-Duk Kim und Kinam Park. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 55(6):721–734, 2003.
- [39] N. D. Sonawane, Jr. Szoka, Francis C. und A. S. Verkman. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45):44826–44831, 2003.
- [40] Rikke V. Benjaminsen, Maria A. Matthebjerg, Jonas R. Henriksen, S. Moein Moghimi und Thomas L. Andresen. The possible "Proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21(1):149–157, 2013.
- [41] Zia ur Rehman, Dick Hoekstra und Inge S. Zuhorn. Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: Real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS Nano*, 7(5):3767–3777, 2013.
- [42] Molly E. Martin und Kevin G. Rice. Peptide-guided gene delivery. *The AAPS Journal*, 9(1):E18–E29, 2007.
- [43] Xianghui Liu, Jennifer W. Yang und David M. Lynn. Addition of "charge-shifting" side chains to linear poly(ethyleneimine) enhances cell transfection efficiency. *Biomacromolecules*, 9(7):2063–2071, 2008.
- [44] Yong-beom Lim, Seon-mi Kim, Hearan Suh und Jong-sang Park. Biodegradable, endosome disruptive und cationic network-type polymer as a highly efficient and nontoxic gene delivery carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 13(5):952–957, 2002.
- [45] Chao Lin, Zhiyuan Zhong, Martin C. Lok, Xulin Jiang, Wim E. Hennink, Jan Feijen, und Johan F. J. Engbersen. Novel bioreducible poly(amido amine)s for highly efficient gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 18(1):138–145, 2007.
- [46] Shahrouz Taranejoo, Jun Liu, Paul Verma und Kerry Hourigan. A review of the developments of characteristics of PEI derivatives for gene delivery applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(25):42096/1–42096/8, 2015.
- [47] Bingqi Zhang und Surya Mallapragada. The mechanism of selective transfection mediated by pentablock copolymers; Part I: Investigation of cellular uptake . *Acta Biomaterialia*, 7(4):1570–1579, 2011.

- [48] Bingqi Zhang und Surya Mallapragada. The mechanism of selective transfection mediated by pentablock copolymers; Part II: Nuclear entry and endosomal escape. *Acta Biomaterialia*, 7(4):1580–1587, 2011.
- [49] A. Christy Hunter und S. Moein Moghimi. Cationic carriers of genetic material and cell death: A mitochondrial tale. *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics*, 1797(6-7):1203–1209, 2010.
- [50] Otmane Boussif, Frank Lezoualc'h, Maria Antonietta Zanta, Mojgan Djavaheri Mergny, Daniel Scherman, Barbara Demeneix und Jean-Paul Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16):7297–7301, 1995.
- [51] Cheol-Hee Ahn, Su Young Chae, You Han Bae und Sung Wan Kim. Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 80(1-3):273–282, 2002.
- [52] W.T. Godbey, Michael A. Barry, Peter Saggau, Kenneth K. Wu und Antonios G. Mikos. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3):321–328, 2000.
- [53] Alessandra Boletta, Ariela Benigni, Jens Lutz, Giuseppe Remuzzi, Marco R. Soria und Lucia Monaco. Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Human Gene Therapy*, 8(10):1243–1251, 1997.
- [54] Fu-Wei Huang, Jun Feng, Jun Nie, Si-Xue Cheng, Xian-Zheng Zhang und Ren-Xi Zhuo. Convenient preparation of biodegradable PEI-containing polymers as non-viral vectors for gene transfection. *Macromolecular Bioscience*, 9(12):1176–1184, 2009.
- [55] Lei Chen, Huayu Tian, Jie Chen, Xuesi Chen, Yubin Huang und Xiabin Jing. Multi-armed poly(L-glutamic acid)-graft-oligoethylenimine copolymers as efficient nonviral gene delivery vectors. *The Journal of Gene Medicine*, 12(1):64–76, 2010.
- [56] Kokhou Wong, Guobin Sun, Xueqing Zhang, Hui Dai, Ye Liu, Chaobin He und Kam W. Leong. Pei-g-chitosan, a novel gene delivery system with transfection efficiency comparable to polyethylenimine *in Vitro* and after liver administration *in Vivo*. *Bioconjugate Chemistry*, 17(1):152–158, 2006.

- [57] Rui Deng, Yanan Yue, Fan Jin, Yangchao Chen, Hsiang-Fu Kung, Marie C. M. Lin und Chi Wu. Revisit the complexation of PEI and DNA - How to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure?. *Journal of Controlled Release*, 140(1):40–46, 2009.
- [58] Julia Kloeckner, Ernst Wagner und Manfred Ogris. Degradable gene carriers based on oligomerized polyamines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(5):414–425, 2006.
- [59] Ali Dehshahri, Reza K. Oskuee, Wayne T. Shier, Arash Hatefi und Mohammad Ramezani. Gene transfer efficiency of high primary amine content, hydrophobic, alkyl-oligoamine derivatives of polyethylenimine. *Biomaterials*, 30(25):4187–4194, 2009.
- [60] Robert M. Elder, Todd Emrick und Arthi Jayaraman. Understanding the effect of polylysine architecture on DNA binding using molecular dynamics simulations. *Biomacromolecules*, 12(11):3870–3879, 2011.
- [61] M. Walsh, M. Tangney, M. J. O'Neill, J. O. Larkin, D. M. Soden, S. L. McKenna, R. Darcy, G. C. O'Sullivan und C. M. O'Driscoll. Evaluation of cellular uptake and gene transfer efficiency of PEGylated poly-L-lysine compacted DNA: Implications for cancer gene therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 3(6):644–653, 2006.
- [62] Arnaldur Hall, Lin-Ping Wu, Ladan Parhamifar und Seyed Moein Moghimi. Differential modulation of cellular bioenergetics by poly(L-lysine)s of different molecular weights. *Biomacromolecules*, 16(7):2119–2126, 2015.
- [63] Ernst Wagner, Christian Plank, Kurt Zatloukal, Matt Cotten und Max L. Birnstiel. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: Toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17):7934–7938, 1992.
- [64] Sangram Keshari Samal, Mamoni Dash, Sandra Van Vlierberghe, David L. Kaplan, Emo Chiellini, Clemens van Blitterswijk, Lorenzo Moroni und Peter Dubruel. Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chemical Society Reviews*, 41(21):7147–7194, 2012.

- [65] Anthony N. de Belder. *Dextran*. Amersham Biosciences, 2003.
- [66] Thomas Heinze, Tim Liebert, Brigitte Heublein und Stephanie Hornig. Functional polymers based on dextran. *Advances in Polymer Science*, 205(Polysaccharides II):199–291, 2006.
- [67] Stephanie Hornig, Tim Liebert und Thomas Heinze. Structure design of multifunctional furoate and pyroglutamate esters of dextran by polymer-analogous reactions. *Macromolecular Bioscience*, 7(3):297–306, 2007.
- [68] Catherine Taylor, Norman W. H. Cheetham und Gwen J. Walker. Application of high-performance liquid chromatography to a study of branching in dextrans. *Carbohydrate Research*, 137:1–12, 1985.
- [69] E. L. Rosenfeld und I. S. Lukomskaya. Splitting of dextran and isomaltose by animal tissues. *Clinica Chimica Acta*, 2:105–114, 1957.
- [70] Theodore W. Sery und Edward J. Hehre. Degradation of dextrans by enzymes of intestinal bacteria. *Journal of Bacteriology*, 71:373–380, 1956.
- [71] Afeesh R. Unnithan, Nasser A. M. Barakat, P. B. Tirupathi Pichiah, Gopalsamy Gnanasekaran, R. Nirmala, Youn-Soo Cha, Che-Hun Jung, Mohamed El-Newehy und Hak Yong Kim. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl. *Carbohydrate Polymers*, 90(4):1786–1793, 2012.
- [72] Joseph S. Pagano und Antti Vaheri. Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D). *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 17(3-4):456–464, 1965.
- [73] Perry G. Rigby. Prolongation of survival of tumour-bearing animals by transfer to "immune" RNA with DEAE-dextran. *Nature*, 221(5184):968–969, 1969.
- [74] Dagmar Fischer, Youxin Li, Barbara Ahlemeyer, Josef Krieglstein und Thomas Kissel. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7):1121–1131, 2003.
- [75] Kaijin Mai, Shanshan Zhang, Bing Liang, Cong Gao, Wenjun Du und Li-Ming Zhang. Water soluble cationic dextran derivatives containing poly(amidoamine) dendrons for efficient gene delivery. *Carbohydrate Polymers*, 123:237–245, 2015.

- [76] Tony Azzam, Hagit Eliyahu, Libi Shapira, Michal Linial, Yechezkel Barenholz und Abraham J. Domb. Polysaccharide-oligoamine based conjugates for gene delivery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9):1817–1824, 2002.
- [77] Tony Azzam und Abraham J. Domb. Cationic polysaccharides for gene delivery. In Mansoor M. Amiji, editor, *Polymeric Gene Delivery*, pages 279–299. CRC Press LLC, 2005.
- [78] Jane Joy Thomas, M. R. Rekha und Chandra P. Sharma. Dextran-protamine polycation: An efficient nonviral and haemocompatible gene delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1):195–205, 2010.
- [79] Jenny E. Parraga, Giovanni K. Zorzi, Yolanda Diebold, Begona Seijo und Alejandro Sanchez. Nanoparticles based on naturally-occurring biopolymers as versatile delivery platforms for delicate bioactive molecules: An application for ocular gene silencing. *International Journal of Pharmaceutics (Amsterdam, Netherlands)*, 477(1-2):12–20, 2014.
- [80] Wen-Bin Li, Wei Yuan, Fu-Jian Xu, Chen Zhao, Jie Ma und Qi-Min Zhan. Functional study of dextran-graft-poly((2-dimethyl amino)ethyl methacrylate) gene delivery vector for tumor therapy. *Journal of Biomaterials Applications*, 28(1):125–135, 2013.
- [81] Kuo Sun, Jing Wang, Jian Zhang, Min Hua, Changsheng Liu und Tongyi Chen. Dextran-g-PEI nanoparticles as a carrier for co-delivery of adriamycin and plasmid into osteosarcoma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(2):173–180, 2011.
- [82] Charles Fortier, Elodie Louvier, Yves Durocher und Gregory De Crescenzo. Tailoring the surface of a gene delivery vector with carboxymethylated dextran: A systematic analysis. *Biomacromolecules*, 16(6):1671–1681, 2015.
- [83] Andrew B. Hughes. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 1 - Origins and Synthesis of Amino Acids*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- [84] Andrew B. Hughes. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 2: Modified Amino Acids, Organocatalysis and Enzymes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

- [85] Andrew B. Hughes. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 4: Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
- [86] Hans Peter Latscha, Uli Kazmaier und Helmut Alfons Klein. *Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [87] Max Bergmann und Leonidas Zervas. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 65(7):1192–1201, 1932.
- [88] Louis A. Carpino und Grace Y. Han. 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society*, 92(19):5748–5749, 1970.
- [89] George W. Anderson und Anne C. McGregor. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 79(23):6180–6183, 1957.
- [90] Robert Bruce Merrifield. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14):2149–2154, 1963.
- [91] Jie Ren, Liang Xin, Yi-Nan Liu und Kong-Jiang Wang. Copolymerization of mixed L- α -arginine with L- α -glutamic acid. *Macromolecules*, 41(6):1996–2002, 2008.
- [92] Daniele Biondini, Lucia Brinchi, Raimondo Germani, Laura Goracci und Gianfranco Savelli. Esterification of unprotected α -amino acids in ionic liquids as the reaction media. *Letters in Organic Chemistry*, 7(1):39–44, 2010.
- [93] Thomas Heinze, Tim Liebert und Andreas Koschella. *Esterification of Polysaccharides*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [94] Massimo Carmeno. A substrate susceptibility screening on penicillin amidase. *Biotechnology Letters*, 16(7):735–736, 1994.
- [95] Shozo Furumoto, Ren Iwata und Tatsuo Ido. Design and synthesis of fluorine-18 labeled matrix metalloproteinase inhibitors for cancer imaging. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 45(11):975–986, 2002.

- [96] Chee-Youb Won und Chih-Chang Chu. Inulin polysaccharide having pendant amino acids: Synthesis and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 70(5):953–963, 1998.
- [97] Yoshitaka Ikeuchi, Fareha Zafar Khan, Naoya Onishi, Masashi Shiotsuki, Toshio Masuda, Yoshiyuki Nishio und Fumio Sanda. Amino acid-functionalized ethyl cellulose: Synthesis, characterization und gas permeation properties. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 48(18):3986–3993, 2010.
- [98] Kesavan Devarayan, Masakazu Hachisu, Jun Araki und Kousaku Ohkawa. Synthesis of peptide–cellulose conjugate mediated by a soluble cellulose derivative having β -Ala esters (II): conjugates with O-phospho-L-serine-containing peptides. *Cellulose*, 20(1):365–378, 2013.
- [99] Bhandya R. Somashekar und Soundar Divakar. Enzymatic syntheses of L-valyl, L-leucyl and L-isoleucyl esters of carbohydrates using *Candida rugosa* lipase. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 46B(12):2026–2044, 2007.
- [100] Maureen D. Brown, Alexander I. Gray, Laurence Tetley, Ana Santovena, Judith Rene undreas G. Schätzlein und Ijeoma F. Uchegbu. *In vitro* and *in vivo* gene transfer with poly(amino acid) vesicles. *Journal of Controlled Release*, 93(2):193–211, 2003.
- [101] Jonathan M. Bennis, Joon-Sig Choi, Ram I. Mahato, Jong-Sang Park und Sung Wan Kim. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjugate Chemistry*, 11(5):637–645, 2000.
- [102] Masahiko Furuhashi, Tomohiro Izumisawa, Hiroko Kawakami, Kazunori Toma, Yoshiyuki Hattori und Yoshie Maitani. Decaarginine-PEG-liposome enhanced transfection efficiency and function of arginine length and PEG. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1–2):40 – 46, 2009.
- [103] S. M. W. van Rossenberg, A. C. I. van Keulen, J-W Drijfhout, S. Vasto, H. K. Koerten, F. Spies, J. M. van 't Noordende, Th J. C. van Berkel und E. A. L. Biessen. Stable polyplexes based on arginine-containing oligopeptides for *in vivo* gene delivery. *Gene Therapy*, 11(5):457–464, 2004.

- [104] Rajkumar Sunil Singh und Arabinda Chaudhuri. Single additional methylene group in the head-group region imparts high gene transfer efficacy to a transfection-incompetent cationic lipid. *FEBS Letters*, 556(1-3):86–90, 2004.
- [105] Heinz A. Staab. Synthesis, properties und preparative use of N,N'-carbonyldiimidazole. *Angewandte Chemie*, 68:754, 1956.
- [106] Heinz A. Staab. Syntheses with heterocyclic amides (azolides). *Angewandte Chemie*, 74:407–423, 1962.
- [107] Paul Albert Stadler. Eine einfache Veresterungsmethode im Eintopf-Verfahren. *Helvetica Chimica Acta*, 61(5):1675–1681, 1978.
- [108] Tim Liebert, Jana Wotschadlo, Peggy Laudeley und Thomas Heinze. Melttable dextran esters as biocompatible and functional coating materials. *Biomacromolecules*, 12(8):3107–3113, 2011.
- [109] M. Zaoral und Z. Arnold. A novel peptide synthesis. *Tetrahedron Letters*, 1(35):9–12, 1960.
- [110] N. D. Bhatt und K. Nimavat. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of methyl 1-(2-amine-alkylcarbonyl)-piperidine-4-carboxylate. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*, 2(2):11–15, 2013.
- [111] Toshiro Morooka, Misato Norimoto, Tadashi Yamada und Nobuo Shiraishi. Dielectric properties of cellulose acylates. *Journal of Applied Polymer Science*, 29(12):3981–3990, 1984.
- [112] Tim Liebert, Matilde C. V. Nagel, Torsten Jordan undreas Heft, Bernd Grünler und Thomas Heinze. Pure, transparent-melting starch esters: Synthesis and characterization. *Macromolecular Rapid Communications*, 32(17):1312–1318, 2011.
- [113] Robert Hampe und Thomas Heinze. Studies about the solvent-dependent substitution pattern of starch acetates. *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(10):1188–1196, 2014.
- [114] Sumner Levine. Synthesis of glycyl and alanyl chlorides. *Journal of the American Chemical Society*, 76:1382, 1954.

- [115] Tapas Kar und Steve Scheiner. Cooperativity of conventional and unconventional hydrogen bonds involving imidazole. *International Journal of Quantum Chemistry*, 106(4):843–851, 2006.
- [116] Maria A. Trachsel, Philipp Ottiger, Hans-Martin Frey, Chantal Pfaffen, Angela Bihlmeier, Wim Klopper und Samuel Leutwyler. Modeling the histidine–phenylalanine interaction: The $\text{NH}\cdots\pi$ hydrogen bond of imidazole–benzene. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(25):7778–7790, 2015.
- [117] Milan Remko und Steve Scheiner. *Ab initio* investigation of hydrogen bonding by carbamates: complexes including methyl methylcarbamate, methyl phenylcarbamate, dimethyl ether und methyl acetate. *Journal of Molecular Structure: Theoretical*, 50:19–24, 1988.
- [118] Sadao Mori und Howard G. Barth. *Size Exclusion Chromatography*. Springer-Verlag, 1999.
- [119] Stefan Funkner, Martina Havenith und Gerhard Schwaab. Urea, a structure breaker? Answers from THz absorption spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(45):13374–13380, 2012.
- [120] Franz Hofmeister. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 24(4):247–260, 1888.
- [121] Yanjie Zhang und Paul S. Cremer. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6):658–663, 2006.
- [122] Charles E. Carraher und Minoru Tsuda. *Modification of Polymers*. American Chemical Society, Washington, D.C., 1980.
- [123] Stephen J. Milner, Alexandra Seve, Anna M. Snelling, Gavin H. Thomas, Kevin G. Kerr, Anne Routledge und Anne-Kathrin Duhme-Klair. Staphyloferrin A as siderophore-component in fluoroquinolone-based Trojan horse antibiotics. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(21):3461–3468, 2013.
- [124] Luca Sancineto, Caterina Tidei, Luana Bagnoli, Francesca Marini, Eder J. Lenardao und Claudio Santi. Selenium catalyzed oxidation of aldehydes: green synthesis of carboxylic acids and esters. *Molecules*, 20(6):10496–10510, 2015.

- [125] Junchen Wu, Tao Yi, Tianmin Shu, Mengxiao Yu, Zhiguo Zhou, Miao Xu, Yifeng Zhou, Huijun Zhang, Jiantao Han, Fuyou Li und Chunhui Huang. Ultrasound switch and thermal self-repair of morphology and surface wettability in a cholesterol-based self-assembly system. *Angewandte Chemie, International Edition*, 47(6):1063–1067, 2008.
- [126] G. Arivazhagan, R. Shanmugam und A. Elangovan. Molecular interaction study of the diisopropyl ether-propionic acid mixture by spectroscopic and dielectric studies. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 81(1):172–177, 2011.
- [127] Chee-Youb Won. Synthesis of heterobifunctional poly(ethylene glycol) containing an acryloyl group at one end and an isocyanate group at the other end. *Polymer Bulletin*, 52(2):109–115, 2004.
- [128] Chao Lin, Cees-Jan Blaauboer, Miguel Mateos Timoneda, Martin C. Lok, Mies van Steenberg, Wim E. Hennink, Zhiyuan Zhong, Jan Feijen und Johan F. J. Engbersen. Bio reducible poly(amido amine)s with oligoamine side chains: Synthesis, characterization und structural effects on gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 126(2):166–174, 2008.
- [129] Mei Ou, Xu-Li Wang, Rongzuo Xu, Chien-Wen Chang, David A. Bull und Sung Wan Kim. Novel biodegradable poly(disulfide amine)s for gene delivery with high efficiency and low cytotoxicity. *Bioconjugate Chemistry*, 19(3):626–633, 2008.
- [130] Walfred S. Saari und Thorsten E. Fischer. A convenient and versatile synthesis of chiral aliphatic and allylic amines. *Synthesis*, (6):453–454, 1990.
- [131] Florine Cavelier und Christine Enjalbal. Studies of selective Boc removal in the presence of silyl ethers. *Tetrahedron Letters*, 37(29):5131–5134, 1996.
- [132] Richard A. Houghten, Alan Beckman und John M. Ostresh. Use of 10N- α -tertiary-butyloxycarbonyl group during solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide & Protein Research*, 27(6):653–658, 1986.
- [133] Paolo Strazzolini, Nazareno Misuri und Pierluigi Polese. Efficient cleavage of carboxylic tert-butyl and 1-adamantyl esters, and N-Boc-amines using H_2SO_4 in CH_2Cl_2 . *Tetrahedron Letters*, 46(12):2075–2078, 2005.

- [134] Hung Duy Phan, Tomoya Yokoyama und Yuji Matsumoto. Direct participation of counter anion in acid hydrolysis of glycoside. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10:7382–7391, 2012.
- [135] Herbert Dautzenberg, Werner Jaeger, Joachim Kötz, Burkart Philipp und Dorothea Stscherbina. *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Hanser/Gardner, 1994.
- [136] Michael Wagner, Christian Pietsch, Lutz Tauhardt, Anja Schallon und Ulrich S. Schubert. Characterization of cationic polymers by asymmetric flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering-A comparison with traditional techniques. *Journal of Chromatography A*, 1325:195–203, 2014.
- [137] Trushar R. Patel, Stephen E. Harding, Anna Ebringerova, Marcin Deszczynski, Zdenka Hromadkova, Adiaratou Togola, Berit Smestad Paulsen, Gordon A. Morris und Arthur J. Rowe. Weak self-association in a carbohydrate system. *Biophysical Journal*, 93(3):741–749, 2007.
- [138] Thomas Heinze, Melanie Nikolajski, Stephan Daus, Tabot M. D. Besong, Nico Michaelis, Peter Berlin, Gordon A. Morris, Arthur J. Rowe und Stephen E. Harding. Protein-like oligomerization of carbohydrates. *Angewandte Chemie, International Edition*, 50(37):8602–8604, 2011.
- [139] Masamichi Tsuboi, Tadao Takenishi und Asao Nakamuba. Some characteristic frequencies of amino acids. *Spectrochimica Acta*, 19(1):271–284, 1963.
- [140] Houjuan Zhu, Yajun Zhang, Lulu Zhang, Tao Yu, Kui Zhang, Hui Jiang, Lijun Wu und Suhua Wang. Highly photostable and biocompatible graphene oxides with amino acid functionalities. *Journal of Materials Chemistry C*, 2:7126–7132, 2014.
- [141] L. I. Berezhinsky, G. I. Dovbeshko, M.P. Lisitsa und G. S. Litvinov. Vibrational spectra of crystalline β -alanine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 54(2):349–358, 1998.
- [142] Nadir Naveed Siddiqui, Afsheen Aman, Alba Silipo, Shah Ali Ul Qader und Antonio Molinaro. Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Carbohydrate Polymers*, 99:331–338, 2014.

- [143] Thomas Elschner, Holger Wondraczek und Thomas Heinze. Syntheses and detailed structure characterization of dextran carbonates. *Carbohydrate Polymers*, 93(1):216–223, 2013.
- [144] Susan M. Alex und Chandra P. Sharma. Enhanced intracellular uptake and endocytic pathway selection mediated by hemocompatible ornithine grafted chitosan polycation for gene delivery. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 122:792–800, 2014.
- [145] Mengmeng Cai, Zhenguo Zhang, Xin Su, Hui Dong, Zhenlin Zhong und Renxi Zhuo. Guanidinated multi-arm star polyornithines with a polyethylenimine core for gene delivery. *Polymer*, 55(18):4634–4640, 2014.
- [146] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott und K. M. Jones. *Data for biochemical research (third edition)*. Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1987.
- [147] B. P. Dey und S. C. Lahiri. Dissociation constants of esters of glycine and leucine in different mixed solvents. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Physical, Theoretical & Analytical*, 27A(11):979–982, 1988.
- [148] Andrew Williams und William P. Jencks. Acid and base catalysis of urea synthesis: nonlinear Bronsted plots consistent with a diffusion-controlled proton-transfer mechanism and the reactions of imidazole and N-methylimidazole with cyanic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 15:1760–1768, 1974.
- [149] R. W. Hay und P. J. Morris. Proton ionization constants and kinetics of base hydrolysis of α -amino acid esters in aqueous solution. III. Hydrolysis and intramolecular aminolysis of α,ω -diamino acid methyl esters. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry*, (8):1021–1029, 1972.
- [150] R. W. Hay und L. J. Porter. Proton ionisation constants and kinetics of base hydrolysis of some small α -amino-acid esters in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, (12):1261–1264, 1967.
- [151] R. W. Hay und P. J. Morris. Proton ionisation constants and kinetics of base hydrolysis of some small α -amino-acid esters in aqueous solution. Part II. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, (8):1577–1582, 1970.

- [152] Cintia Salomao Pinto Zarth, Lidija Fras Zemljic, Dusko Cakara, Matej Bracic, Annett Pfeifer, Karin Stana-Kleinschek und Thomas Heinze. Charging behavior and stability of the novel amino group containing cellulose ester cellulose-4-[N-methylamino]butyrate hydrochloride. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 213(16):1669–1676, 2012.
- [153] Béla Noszál, Dóra Visky und Márta Kraszni. Characterization of ester hydrolysis in terms of microscopic rate constants. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(29):14507–14514, 2006.
- [154] Dagmar Fischer, Thorsten Bieber, Youxin Li, Hans-Peter Elsässer und Thomas Kissel. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*, 16(8):1273–1279, 1999.
- [155] Dagmar Fischer. *In vivo* fate of polymeric gene carriers. In *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids*, pages 295–321. CRC Press LLC, 2005.
- [156] Roxana Golan, Lia I. Pietrasanta, Wan Hsieh und Helen G. Hansma. DNA toroids: Stages in condensation. *Biochemistry*, 38(42):14069–14076, 1999.
- [157] Manisha P. Desai, Vinod Labhasetwar, Elke Walter, Robert J. Levy und Gordon L. Amidon. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14(11):1568–1573, 1997.
- [158] Meredith A. Mintzer und Eric E. Simanek. Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical Reviews*, 109(2):259–302, 2009.
- [159] ASTM International, West Conshohocken, PA. *ASTM F756-08, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*, 2013.
- [160] European Standard EN ISO 10993-5, Brussels. *DIN EN ISO 10993-5:2009-10, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*.
- [161] Bijay Singh, Sushila Maharjan, Tae-Eun Park, Tao Jiang, Sang-Kee Kang, Yun-Jaie Choi und Chong-Su Cho. Tuning the buffering capacity of polyethylenimine with glycerol molecules for efficient gene delivery: Staying in or out of the endosomes. *Macromolecular Bioscience*, 15(5):622–635, 2015.

- [162] Igor Y. Perevyazko, Marius Bauer, Georges M. Pavlov, Stephanie Hoepfner, Stephanie Schubert, Dagmar Fischer und Ulrich S. Schubert. Polyelectrolyte complexes of DNA and linear PEI: Formation, composition and properties. *Langmuir*, 28(46):16167–16176, 2012.
- [163] Guo Xi Zhao, Hiroyuki Tanaka, Chan Woo Kim, Kai Li, Daiki Funamoto, Takahiro Nobori, Yuta Nakamura, Takuro Niidome, Akihiro Kishimura, Takeshi Mori und Yoshiki Katayama. Histidinylated poly-L-lysine-based vectors for cancer-specific gene expression via enhancing the endosomal escape. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(5):519–534, 2014.
- [164] Matthias Zink. *Entwicklung innovativer nicht-viraler Vektoren zur Gentherapie*. PhD thesis, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2015.
- [165] Janusz Oszczapowicz und Mariola Kuminska. Amidines. Part 32. Influence of substitution at the amino nitrogen atom on the sensitivity to substitution at the imino nitrogen atom. pK_a Values of N1-methyl-N1-phenylformamidines in water-ethanol solutions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1):103–107, 1994.
- [166] Derek J. Chadwick und Raphael I. Ngochindo. 2,5-Dilithiation of N-protected imidazoles. Syntheses of 2,5-disubstituted derivatives of 1-methoxymethyl-, 1-triphenylmethyl-, and 1-(N,N-dimethylsulphonamido)-imidazole. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (3):481–486, 1984.
- [167] Susruta Majumdar, Maren Mueller-Spaeth und Kenneth B. Sloan. Prodrugs of theophylline incorporating ethyleneoxy groups in the promoiety: Synthesis, characterization und transdermal delivery. *AAPS PharmSciTech*, 13(3):853–862, 2012.
- [168] Z. Kosturkiewicz, E. Ciszak und E. Tykarska. Configuration of amidines and factors governing their hydrogen-bonding patterns. *Acta Crystallographica Section B*, 48(4):471–476, 1992.
- [169] Hengzhen Qi, Xinyao Li und Jiayi Xu. Stereoselective control in the Staudinger reactions involving monosubstituted ketenes with electron acceptor substituents: experimental investigation and theoretical rationalization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(8):2702–2714, 2011.

- [170] Cyril B. Dousson, Nicola M. Heron und George B. Hill. Valuable synthetic building blocks: Useful 2-substituted 5-aminopyrimidines from a stable precursor. *Synthesis*, (11):1817–1821, 2005.
- [171] Jan Bergman und Peter Sand. Synthesis of indoles via ring closure of 2-alkylnitroaniline derivatives. *Tetrahedron*, 46(17):6085–6112, 1990.
- [172] Dean Toste, James McNulty und Ian W. J. Still. Formamidine as a versatile protecting group for primary amines: a mild procedure for hydrolytic removal. *Synthetic Communications*, 24(11):1617–1624, 1994.
- [173] Hellmut Brederick. Acid amide reactions. XLVI. Synthesis of N,N,N'-trimethylformamidine and bis(dimethylamino)methoxymethane (aminal ester). *Chemische Berichte*, 98(4):1078–1080, 1965.
- [174] Gerhard V. Boyd, Peter F. Lindley und George A. Nicolaou. 1-chloro-1,3-bis(dimethylamino)-2-azapropenylium salts: intermediates for the synthesis of 1,3,5-triazines, pyrimidines, isoquinolines, quinazolines und a 1,3,5-thiadiazinium salt. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16):1105–1107, 1984.
- [175] Petr Jansa, Antonín Holý, Martin Dračinský, Viktor Kolman, Zlatko Janeba, Eva Kmoníčková und Zdeněk Zidek. Synthesis and structure–activity relationship studies of polysubstituted pyrimidines as inhibitors of immune-activated nitric oxide production. *Medicinal Chemistry Research*, 24(5):2154–2166, 2015.
- [176] M. Hanocq, M. Van Damme und R. Fuks. Determination of acidity constants of N,N'-substituted amidines. Relations between pK_A and IR vibrations. I. Acetamidines and methacrylamidines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 3(1):29–39, 1985.
- [177] M.K. Rofouei, E. Fereyduni, N. Sohrabi, M. Shamsipur, J. Attar Gharamaleki und N. Sundaraganesan. Synthesis, X-ray crystallography characterization, vibrational spectroscopic, molecular electrostatic potential maps, thermodynamic properties studies of N,N'-di(p-thiazole)formamidine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1):88–95, 2011.
- [178] Peter Dubruel. Physicochemical and biological evaluation of cationic polymethacrylates as vectors for gene delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(3-4):211–220, 2003.

- [179] Jianhai Yang, Yuan Liu, Hongbo Wang, Lu Liu, Wei Wang, Chuandong Wang, Qin Wang und Wenguang Liu. The biocompatibility of fatty acid modified dextran-aggmatine bioconjugate gene delivery vector. *Biomaterials*, 33(2):604–613, 2012.
- [180] Wolfgang Schöniger. Die mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogenen und Schwefel in organischen Verbindungen. *Microchimica Acta*, 44(4-6):869–876, 1956.
- [181] Lidija Fras Zemljic, Dusko Cakara, Nico Michaelis, Thomas Heinze und Karin Stana Kleinschek. Protonation behavior of 6-deoxy-6-(2-aminoethyl)amino cellulose: a potentiometric titration study. *Cellulose*, 18(1):33–43, 2011.
- [182] Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1):55–63, 1983.
- [183] Marius Bauer, Christian Lautenschlaeger, Kristian Kempe, Lutz Tauhardt, Ulrich S. Schubert und Dagmar Fischer. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly(ethylene glycol): Comparison of *in vitro* cytotoxicity and hemocompatibility. *Macromolecular Bioscience*, 12(7):986–998, 2012.
- [184] ASTM International, West Conshohocken, PA. *ASTM F756-08, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*.
- [185] European Standard EN ISO 10993-4, Brussels. *DIN EN ISO 10993-4:2009-10, Biological Evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood*.
- [186] M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis und E. Wagner. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy*, 6(4):595–605, 1999.
- [187] Sofia Ochrimenko, Antje Vollrath, Lutz Tauhardt, Kristian Kempe, Stephanie Schubert, Ulrich S. Schubert und Dagmar Fischer. Dextran-graft-linear poly(ethylene imine)s for gene delivery: Importance of the linking strategy. *Carbohydrate Polymers*, 113:597–606, 2014.

Publikationen

Artikel

Konrad Hotzel, Thomas Heinze. *Novel dextran derivatives with unconventional structure formed in an efficient one-pot synthesis* Carbohydrate Research 434: 77-82, 2016

Patent

Dagmar Fischer, Thomas Heinze, Matthias Zink, Konrad Hotzel. *Neue Dextranderivate als Wirkstoffträgersystem* DE 10 2014 016 901 A1, 17.03.2016

Vorträge

Konrad Hotzel. *Amino acid substituted Dextran based non-viral vectors for gene delivery: synthesis and characterization* Symposium „Nanomedicine“, März 2015, Jena

Poster

Konrad Hotzel, Thomas Heinze. *Polycationization of Dextran with amino acids* CRS Local Chapter Germany, März 2011, Jena

Sofia Ochrimenko, Marlies Stampniok, Holger Wondraczek, Konrad Hotzel, Ulrich S. Schubert, Thomas Heinze, Dagmar Fischer. *Dialkylaminoethyl-Dextrans for gene delivery: Investigation of structure-activity relationships* CRS Local Chapter Germany, März 2011, Jena

Konrad Hotzel, Thomas Heinze. *Polycationization of Dextran via esterification of amino acids* NanoConsens Abschlußmeeting, September 2012, Jena

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Thomas Heinze für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe auf diesem interessanten Thema forschen zu können. Dabei weiß ich es zu schätzen, daß er mir Freiheiten ließ, aber stets mit Rat zur Seite stand, wenn ich welchen benötigte.

Weiterer Dank gebührt Prof. Dr. Dagmar Fischer vom Institut für Pharmazie für die langjährige fruchtbare Kooperation, die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt Matthias Zink für die gute Zusammenarbeit all die Jahre, der mit meinen Proben interessante Dinge anstellte und mir geduldig immer wieder erklärte, was es war.

Ich danke Assoc. Prof. Dr. Lidija Fras Zemljč vom *Laboratory for Characterization and Processing of Polymers* in Maribor, Slowenien für die Möglichkeit, dort Räume und Geräte zu nutzen, sowie Matej Bračič für die Unterstützung, die er mir bei den Experimenten zukommen ließ.

Einigen Mitarbeitern am IOMC bin ich ebenfalls zu besonderem Dank verpflichtet, sähen ohne Frau Sentis (NMR und IR), Frau Lentvogt (Elementaranalyse) und Dr. Günther und Dr. Bellstedt (NMR) viele Dinge in dieser Arbeit anders aus.

Danke auch an meine unzähligen Laborkollegen für die Atmosphäre, die Gespräche und Anregungen, die sich im Lauf der Zeit ergaben. Besonders hervorheben möchte ich hier Peggy, Holger, Robert und Velina. Allen anderen Mitarbeitern der AG Heinze möchte ich auch für die schöne Zeit am IOMC danken, ich bin doch gern auf Arbeit gegangen.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und meiner Familie natürlich auch den Platz einräumen, der ihnen gebührt, denn das Leben hat nicht immer nur mit Chemie zu tun. In wahlloser Reihenfolge und ohne Vollständigkeitsanspruch: Tom, Vinz, CJ, Bowie und Küp, Sandra, Mama, Papa, Oma, Ebru und Alice und und und...

Euch allen sage ich auch herzlichst Danke!

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen erstellt habe. Weder Teile von ihr noch die ganze Arbeit wurden an dieser oder einer anderen Universität zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.) bereits vorgelegt.

Jena, den 30.06.2016

Konrad Hotzel